

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

MARCO ANTONIO PERPÉTUO DE SOUSA

**Identificação de novos microRNAs em tecido testicular de
bovinos *Bos indicus***

Araçatuba
2023

MARCO ANTONIO PERPÉTUO DE SOUSA

**Identificação de novos microRNAs em tecido testicular de
bovinos *Bos indicus***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Rufino Salinas Fortes

Coorientadoras: Profa. Dra. Flávia Lombardi Lopes e Profa. Dra. Andressa Oliveira de Lima

Araçatuba

2023

S725i

Sousa, Marco Antonio Perpétuo de

Identificação de novos microRNAs em tecido testicular de bovinos
Bos indicus / Marco Antonio Perpétuo de Sousa. -- Araçatuba, 2023
101 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Marina Rufino Salinas Fortes

Coorientadora: Flávia Lombardi Lopes, Andressa Oliveira de Lima

1. microRNA. 2. Anotação Funcional. 3. Reprodução. 4. Bovinos. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

Identificação de novos microRNAs em tecido testicular de bovinos *Bos indicus*

AUTOR: MARCO ANTONIO PERPÉTUO DE SOUSA
ORIENTADORA: MARINA RUFINO SALINAS FORTES
COORDINADORA: FLÁVIA LOMBARDI LOPES
COORDINADORA: ANDRESSA OLIVEIRA DE LIMA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal,
área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARINA RUFINO SALINAS FORTES (Participação Virtual)
The University of Queensland

Prof. Dr. YURI TANI UTSUNOMIYA (Participação Presencial)
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Prof. Associado GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA (Participação Presencial)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Dr. DANIEL ROBERT ARNOLD (Participação Presencial)
Doutor em Ciências Veterinárias pela Université de Montreal, UdeM, Canadá

Profa. Dra. ELIANE PATRÍCIA CERVELATTI (Participação Presencial)
Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium / Unidade de Araçatuba

Araçatuba, 10 de julho de 2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

Identificação de novos microRNAs em tecido testicular de bovinos *Bos indicus*

AUTOR: MARCO ANTONIO PERPÉTUO DE SOUSA
ORIENTADORA: MARINA RUFINO SALINAS FORTES
COORDENADORA: FLÁVIA LOMBARDI LOPES
COORDENADORA: ANDRESSA OLIVEIRA DE LIMA

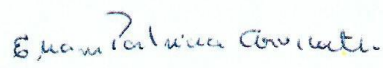
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal,
área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARINA RUFINO SALINAS FORTES (Participação Virtual)
The University of Queensland

Prof. Dr. YURI TANI UTSUNOMIYA (Participação Presencial) 
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Prof. Associado GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA (Participação Presencial) 
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Dr. DANIEL ROBERT ARNOLD (Participação Presencial) 
Doutor em Ciências Veterinárias pela Université de Montreal, UdeM, Canada

Profa. Dra. ELIANE PATRÍCIA CERVELATTI (Participação Presencial) 
Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium / Unidade de Araçatuba

Araçatuba, 10 de julho de 2023.

*À minha amada mãe Cláudia,
mulher forte como rocha,
e à Melissa e Nicholas,
filhos maravilhosos!
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – Campus de Araçatuba.

A CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A professora Marina Fortes, que aceitou o desafio de me orientar enfrentando os percalços da distância, contribuindo imensamente para minha formação acadêmica e científica. Uma pessoa maravilhosa que tem a minha profunda gratidão, respeito e admiração.

A minha coorientadora, Andressa Oliveira de Lima que participou intensamente da elaboração deste trabalho sempre à disposição para inúmeras horas de reuniões online enfrentando as dificuldades do fuso horário. Se cheguei até aqui foi por sua dedicação.

A minha coorientadora Flávia Lombardi Lopes por ter acreditado em mim e aberto as portas para a minha vida acadêmica na pós-graduação. Obrigado por sempre poder contar com seus conselhos, seja na vida acadêmica ou pessoal.

A Juliana Afonso por sua disponibilidade nas inúmeras reuniões online e por compartilhar seu valioso saber científico, sempre indicando opções e caminhos para solucionar os mais diversos desafios deste trabalho. Minha eterna gratidão.

A Flávia Athayde por sua mentoria bioinformática, compartilhado seu conhecimento científico e encarando muitas horas de reuniões, dando suporte para a realização deste trabalho. Muito obrigado pela parceria acadêmica e pessoal.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioinformática pelo apoio, dedicação e companheirismo.

A todos os professores das disciplinas cursadas e todos os colegas de turma, parceiros na elaboração e apresentação de trabalhos.

A todos os amigos que fiz na organização dos Simpósios da Pós-Graduação. Foram momentos incríveis.

A Daniela Denadai, minha dupla preferida na pós-graduação, pelo apoio em toda a minha jornada acadêmica e pessoal. Por sempre me socorrer nos momentos em que mais precisei.

Ao Professor José Fernando Garcia por ter me aceitado como estagiário durante o Programa de Aperfeiçoamento e Apoio à Docência no Ensino Superior (PAADES). Obrigado pela cordialidade, professor!

Ao Professor Paulo Patto, coordenador da pós-graduação por sua pronta disponibilidade, cordialidade e profissionalismo.

Aos funcionários do Departamento de pós-graduação por sua costumeira cordialidade.

À Biblioteca da FMVA, em especial a Cristina Alexandra de Godoy, pela disponibilidade e gentileza no auxílio das correções desta tese.

A todos os meus queridos alunos, com os quais sempre compartilhei os desafios e conquistas da vida acadêmica e científica e que, em cada pequena realização no ambiente escolar e pessoal me fazem acreditar que tudo vale a pena.

A Secretaria da Educação do Estado de São Paulo, Diretoria de Ensino de Araçatuba-SP, Diretores Escolares e, em especial, a Gerente de Organização Escolar Kátia da escola EE Profª Purcina Elisa de Almeida pelo afastamento das funções de professor de Biologia que foi concedido durante a realização deste trabalho.

A minha família, minha mãe Cláudia, meus irmãos Paulo, Simone e Camila, filhos Melissa e Nicholas, sobrinhos Thamires, Junior, Clara, Maria Paula, Rafaela e Ravi (além do bebê que está vindo), cunhados Jilly, Cássio e Daniela, primos Rodrigo e Thiago (parceiros na elaboração das imagens) e demais familiares, por estarem sempre comigo, torcendo e vibrando a cada vitória. Da última casa da última rua. Essa é para vocês e por vocês.

“Se te apetece esforçar, esforça-te;
se te apetece repousar, repousa;
se te apetece fugir, fuja;
se te apetece resistir, resista;
mas saiba bem o que te apetece,
e não recue ante nenhum pretexto,
porque o universo se organizará para te dissuadir”.

Friedrich Nietzsche

SOUSA, M. A. P. **Identificação de novos microRNAs em tecido testicular de bovinos *Bos indicus***. 2023. 101 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Os consórcios de anotação genômica funcional fornecem um recurso valioso para pesquisadores no mundo todo. A subespécie *Bos indicus* tem importância econômica relevante devido sua adaptação a climas tropicais e seu genoma requer melhor anotação. Os microRNAs são pequenos RNAs endógenos que atuam na regulação da expressão gênica através da repressão pós-transcricional, ligando-se ao RNA mensageiro de seus genes alvo, levando-os à degradação. O presente trabalho investigou a ocorrência de novos microRNAs em tecido testicular de bovinos *Bos indicus*. Identificamos 85 novos possíveis miRNA em 27 cromossomos sendo 48,24% expressos na cauda do epidídimo, 21,18% no caput do epidídimo e 17,65% no parênquima testicular, dos quais 14 apresentaram similaridade com 19 miRNAs anotados em outras espécies. Os novos miRNAs ocorreram em 978 regiões de QTL, sendo que 12,68% destas regiões estão relacionadas com reprodução e fertilidade. A predição de ligação dos novos miRNAs com seus genes alvo identificou 10 hub miRNAs dos quais 8 tiveram vias enriquecidas para seus genes alvo. O presente estudo descreveu novos miRNAs em tecido testicular e acrescenta informações para o genoma de animais *Bos indicus* fornecendo caminhos para formulação de novas hipóteses e elucidação de processos biológicos, possivelmente relacionados com a fertilidade e reprodução.

Palavras-chave: microRNA. Anotação funcional. Reprodução. Bovinos.

SOUSA, M. A. P. **Identification of new microRNAs in *Bos indicus* bovine testicular tissue. 2023.** 101 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Functional genomic annotation consortia provide a valuable resource for researchers worldwide. The *Bos indicus* subspecies has relevant economic importance due to its adaptation to tropical climates, and its genome requires better annotation. MicroRNAs are small endogenous RNAs that act in the regulation of gene expression by post-transcriptional repression, binding to the messenger RNA of their target genes and leading them to degradation. This study investigated the occurrence of new microRNAs in *Bos indicus* bovine testicular tissue. We identified 85 new possible miRNAs on 27 chromosomes, of which 48.24% were found in the epididymal tail, 21.18% in the epididymal caput, and 17.65% in the testicular parenchyma. Fourteen of these new miRNAs showed similarity with 19 miRNAs annotated in other species. The new miRNAs occurred in 978 QTL regions, of which 12.68% were related to reproduction and fertility. Prediction of the target genes for the new miRNAs identified 10 hub miRNAs. Out of these 8 hub miRNAs had enriched pathways for their target genes. This study described new miRNAs in testicular tissue and added information to the *Bos indicus* genome, providing paths for formulating new hypotheses and elucidating biological processes, potentially related to fertility and reproduction.

Keywords: microRNA. Functional annotation. Reproduction. Bovine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Anatomia do sistema reprodutor masculino de touros.....	22
Figura 2 -	Diferenciação celular da célula germinativa masculina de bovinos	24
Figura 3 -	Biogênese de miRNAs canônicos em metazoários	27
Figura 4 -	Exemplo de saída do programa miRDeep2.....	38
Figura 5 -	Caracterização e distribuição dos novos miRNAs	42
Figura 6 -	Distribuição dos novos miRNAs por tecido.....	43
Figura 7 -	Distribuição de novos miRNAs ocorrendo em regiões de QTL por tecido	59
Figura 8 -	Ocorrência de miRNAs em regiões de QTL por categoria	60
Figura 9 -	Número de genes alvo por novo miRNA	65
Figura 10 -	Ocorrência de genes alvo comuns entre tecidos.....	66
Figura 11 -	Rede de interação entre os novos miRNAs identificados e seus alvos preditos	68
Figura 12 -	Vias enriquecidas dos genes alvo dos hub miRNAs	69

Figura 13 -	Nuvem de palavras da plataforma <i>Animal QTLdb</i> por ano	
		78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Novos miRNAs identificados em tecido testicular bovino de touros <i>Bos indicus</i>	44
Tabela 2 -	Quantidade de novos miRNAs bovinos com similaridade com miRNAs anotados em outras espécies.....	55
Tabela 3 -	Alinhamento BLAST das sequências maduras dos novos miRNAs preditos contra o genoma de outras espécies e as categorias de QTL correspondentes às coordenadas genômicas	56
Tabela 4 -	Ocorrência de novos miRNAs em regiões de QTL relacionadas à reprodução e fertilidade	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Genômica e fertilidade.....	19
2.2 O Sistema reprodutor de touros.....	21
2.2.1 O Sistema reprodutor masculino de bovinos e a gametogênese .	21
2.3 microRNAs e sua relação com a gametogênese	26
2.4 Os consórcios de anotação funcional	29
3 HIPÓTESE	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivos específicos.....	33
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1 Animais e amostras	34
5.2 Extração de RNA, sequenciamento, alinhamento e preparação de bibliotecas	34
5.2.1 Extração	34
5.2.2 Sequenciamento.....	35
5.3 Bioinformática.....	35
5.3.1 Controle de qualidade das bibliotecas	35
5.3.2 Identificação de novos miRNAs utilizando o pacote miRDeep2 ...	36
5.3.2.1 Criação de um arquivo de genoma indexado.....	36
5.3.2.2 Mapeamento das <i>reads</i> contra o genoma de referência indexado	36
5.3.2.3 Identificação dos novos miRNAs	37
5.3.3 Caracterização dos loci dos novos miRNAs	39
5.3.4 Similaridade dos novos miRNAs com miRNAs anotados de outras espécies	39
5.3.5 Ocorrência dos novos miRNAs em regiões de QTL.....	39
5.3.6 Predição de ligação dos novos miRNAs com genes alvo diferencialmente expressos entre os 3 tecidos	40

5.3.7 Criação de rede de interação entre os novos miRNAs e seus genes alvo.....	40
5.3.8 Enriquecimento funcional	40
6 RESULTADOS	41
6.1 Identificação de novos miRNAs	41
6.2 Similaridade entre novos miRNAs identificados em bovinos e miRNAs anotados em espécies conhecidas.....	55
6.3 Ocorrência de novos miRNAs bovinos identificados em regiões de QTL	59
6.4 Predição de genes alvo	63
6.5 Redes de interação entre os miRNAs e seus genes-alvo	67
7 DISCUSSÃO	70
7.1 Animais, descrição geral e caracterização dos novos miRNAs.....	70
7.2 Similaridade com miRNAs anotados em outras espécies.....	72
7.3 Ocorrência dos novos miRNAs em regiões de QTL.....	75
7.4 Alvos, redes e enriquecimento funcional	79
8 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS	82
APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR	93

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de carne bovina do mundo. O rebanho brasileiro ultrapassou 224 milhões de cabeças de gado em 2021. No mesmo ano o valor bruto nominal da produção de leite e carne e leite somados foi aproximadamente 196 bilhões de reais (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA -IBGE, 2021; MILLEN *et al.*, 2011). As duas subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus* possuem o mesmo ancestral (*Bos primigenius*) e tendo origem entre 280.000 e 330.000 anos atrás (UTSUNOMIYA *et al.*, 2019). As raças zebuínas (*Bos indicus*) são originárias da Índia e representam mais de 80% do efetivo bovino nacional. A raça Brahman surgiu nos EUA, foi introduzida no Brasil em 1994 e hoje está presente em mais de 70 países (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE ZEBU - ABCZ, 2023; ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE BRAHMAN DO BRASIL - ACBB, 2023).

Quando comparado com *Bos taurus*, os bovinos *Bos indicus* apresentam uma série de características genéticas adaptativas que favorecem sua criação em regiões tropicais (BURROW, 2012; CARDOSO *et al.*, 2021; PORTO-NETO *et al.*, 2014). Entre elas podemos destacar a tolerância a parasitas internos e externos, o uso de forragens de baixa qualidade e a resistência ao calor (UTSUNOMIYA *et al.*, 2019). A resistência aos efeitos deletérios devido a exposição a altas temperaturas é observada a nível celular, uma vez que embriões de *Bos indicus* são menos propensos a inibição de desenvolvimento quando expostos ao calor que embriões de *Bos taurus* assim como a taxa de conversão alimentar, produção de carne e leite, taxa de crescimento e fertilidade (HANSEN, 2004).

Apesar do fato das duas subespécies apresentarem taxas de sudorese parecidas, animais *Bos indicus* possuem glândulas sudoríparas em maior densidade (MORRELL, 2020). Em condições de aumento de temperatura, a resposta na alteração das taxas de transpiração e respiração entre os dois grupos ocorreu com diferença de 8°C, sendo que o grupo *Bos taurus* foi mais sensível à variação (MORRELL, 2020). O metabolismo basal de *Bos indicus* é menor que o de *Bos taurus* (HANSEN, 2004) gerando menos calor. Os touros Brahman possuem a pelagem curta, lisa e com cores claras, portanto são menos propensos ao estresse térmico. Essas características são importantes para a bovinocultura em regiões quentes e úmidas, ou seja, na maior parte do Brasil.

A tolerância ao calor dos zebuínos também reflete na sua qualidade do sêmen sob estas condições quentes e úmidas. Há vários recursos para prevenir que o calor afete a fisiologia testicular. Os testículos e epidídimo dos bovinos estão localizados no escroto, para manter a temperatura 4-5°C abaixo da temperatura abdominal (MORRELL, 2020) sendo de fundamental importância para a fertilidade, considerando que elevadas temperaturas no testículo impedem a espermatogênese (HANSEN, 2004).

O escroto possui uma pele fina, sem gordura subcutânea e, praticamente, sem pelos e com maior densidade de glândulas sudoríparas que outras partes do corpo. A artéria testicular em touros zebuínos é maior e menos espessa e a distância entre o sangue arterial e venoso também é menor. Esta artéria forma uma vasta rede de vasos superficiais, por onde o calor é dissipado. O músculo cremaster atua na redução do volume do escroto quando contraído, auxiliando na regulação da temperatura. A temperatura da *cauda* do epidídimo é menor que a do parênquima testicular e, menor que a do *caput* do epidídimo. (MORRELL, 2020).

O material genético fica mais vulnerável aos efeitos do calor durante a espermatogênese na fase da meiose, antes da compactação do DNA. O estresse térmico induz a produção de radicais livres (*Reactive Oxygen Species - ROS*), como resultado do metabolismo celular. Eles desempenham um papel importante na função espermática, incluindo capacitação, reação acrossômica e ligação com a zona pelúcida dos ovócitos, portanto, o estresse térmico pode ter um efeito significativo na fertilidade. Os *ROS* quando produzidos em excesso, danificam as membranas e o DNA, induzindo a apoptose e impactando a remodelação da cromatina através da inibição da protaminação (GIBB *et al.*, 2020; MORRELL, 2020).

Espermatogênese e qualidade do sêmen são relacionadas com a fertilidade dos touros e assim afetando a indústria pecuária por ser economicamente relevante e pode melhorar a eficiência da produção e lucratividade. As pesquisas envolvendo a fertilidade de touros, sobretudo gado de corte podem fornecer subsídios para elucidar características relacionadas à reprodução em outras espécies (BUTLER *et al.*, 2020).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Genômica e fertilidade

As métricas utilizadas para medir a fertilidade em bovinos são distintas entre machos e fêmeas. Uma possível métrica para avaliar machos e fêmeas ao mesmo tempo seria a probabilidade de alcançar a prenhez como resultado de um único acasalamento ocorrido entre 4 e 16 horas do início do estro, com um membro do sexo oposto, fértil e amostrado aleatoriamente (TAYLOR; SCHNABEL; SUTOVSKY, 2018).

A avaliação andrológica do touro é um procedimento de baixo custo que investiga a fertilidade. A fertilidade em touros pode ser estabelecida considerando um conjunto de características físicas como a medição da circunferência escrotal e comparação com padrões preestabelecidos de acordo com a idade do animal, fisiológicas que vão desde o diagnóstico de doenças (carcinomas de células escamosas; danos na córnea; linfomas; defeitos no casco; hérnias; lesões no prepúcio, escrotais ou testiculares; linfomas; lacerações, verrugas, cicatrizes e tumores penianos; aderências; vesiculite seminal; abscesso prostrático), até a avaliação do sêmen para verificar a motilidade (no mínimo 30% de motilidade grossa e progressiva) e morfologia espermática (no mínimo 70% de espermatozoides normais) e comportamentais que incluem o impulso sexual e capacidade de acasalamento. Para que um touro seja classificado como reprodutor potencial satisfatório é necessário que passe por todas as categorias examinadas. Um estudo realizado com gado de corte no Brasil em 2011 revelou que a implementação da avaliação andrológica de touros para eliminação de touros inférteis teve uma proporção de 36:1, gerando impacto bioeconômico de custo/benefício (ALEXANDER, 2008; CHENOWETH; MCPHERSON, 2016).

A abordagem mais recente na busca de linhagens eficientes quanto às características reprodutivas tanto de *Bos taurus* quanto de *Bos indicus* é a Seleção Genômica (*Genomic Selection – GS*). Na Seleção Genômica utiliza-se marcadores distribuídos por todo o genoma para estimar o mérito genético da característica estudada e a identificação dos loci de características quantitativas (*Quantitative trait loci – QTL*) (FORTES *et al.*, 2013; GODDARD; HAYES, 2007; TAYLOR; SCHNABEL; SUTOVSKY, 2018).

A Seleção Genômica faz uso de chips comerciais com diferentes densidades, que detectam polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs) e pode ser utilizado para descoberta de novas variantes, sequenciamento completo do genoma, sequenciamento do transcriptoma (que inclui diversas as formas de RNA, tais como RNA mensageiro (mRNA), microRNA (miRNA), pequeno RNA de fita dupla interferente (shRNA), pequenos RNAs (sRNA)) entre outros. Um conjunto de SNPs detectados em uma genotipagem por chip é chamada haplótipo e o par de haplótipos presentes em cada cópia dos cromossomos é chamado diplótipo. Ao analisar os haplótipos dentro de uma população presume-se que se trata de uma área com um conjunto de alelos vitais, pois os indivíduos homozigotos para o haplótipo mutado não teriam sobrevivido. Esta abordagem é útil para detectar tanto variantes mendelianas como deleções, alterações no *splicing*, *frameshift* ou troca de aminoácidos gerando *stop códon* ou silenciamento de genes presentes nos cromossomos sexuais ou, ainda, genes que são silenciados através de metilação em um dos progenitores (TAYLOR; SCHNABEL; SUTOVSKY, 2018).

O sequenciamento do RNA é muito utilizado para quantificar expressão gênica de diferentes tecidos, incluindo tecidos reprodutivos de bovinos fêmea e macho e, desta forma, entender a função gênica em vários estágios de desenvolvimento. O total de estudos de genes candidatos ou QTL associadas a características de reprodução, focados em machos é significativamente menor que o de fêmeas devido a uma série de razões logísticas, especialmente tratando-se de gado de corte, onde as fêmeas são expostas a vários machos durante 2 a 3 ciclos estrais (diferentemente do gado leiteiro, onde a maioria das inseminações é feita de forma artificial, no entanto, na inseminação artificial corre-se o risco de transmitir um gene vital mutado que leva à perda de função para uma grande quantidade de descendentes) (TAYLOR; SCHNABEL; SUTOVSKY, 2018).

A correlação genética entre a fertilidade masculina e feminina é baixa, por este motivo, faz-se necessário melhorar a fertilidade do macho independentemente da fertilidade da fêmea. As características estudadas relacionadas com a fertilidade do macho são herdáveis e desempenham papel importante no desempenho reprodutivo do rebanho. Comumente investiga-se os níveis de concentração dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), idade na puberdade, taxa de concepção do touro, porcentagem de esperma normal, volume e peso testicular e circunferência escrotal, tendo, esta última, herdabilidade moderadamente alta. A circunferência

escrotal pode ser um fator indireto na melhoria da genética da fertilidade de fêmeas (CHENOWETH, 1994).

Há uma vasta variação gênica distribuída por vários cromossomos, revelando a complexidade dos traços reprodutivos. As abordagens mais recentes que envolvem o Sequenciamento de Nova Geração tem o objetivo de identificar genes candidatos responsáveis pelas características ou mutações causais (FORTES *et al.*, 2013; GODDARD; HAYES, 2007; TAYLOR; SCHNABEL; SUTOVSKY, 2018).

2.2 O Sistema reprodutor de touros

2.2.1 O Sistema reprodutor masculino de bovinos e a gametogênese

O Sistema reprodutor masculino de bovinos é composto por escroto, plexo pampiniforme, testículo, epidídimo, glândulas acessórias, pênis e prepúcio (FAYRER-HOSKEN, 1997) (Figura 1).

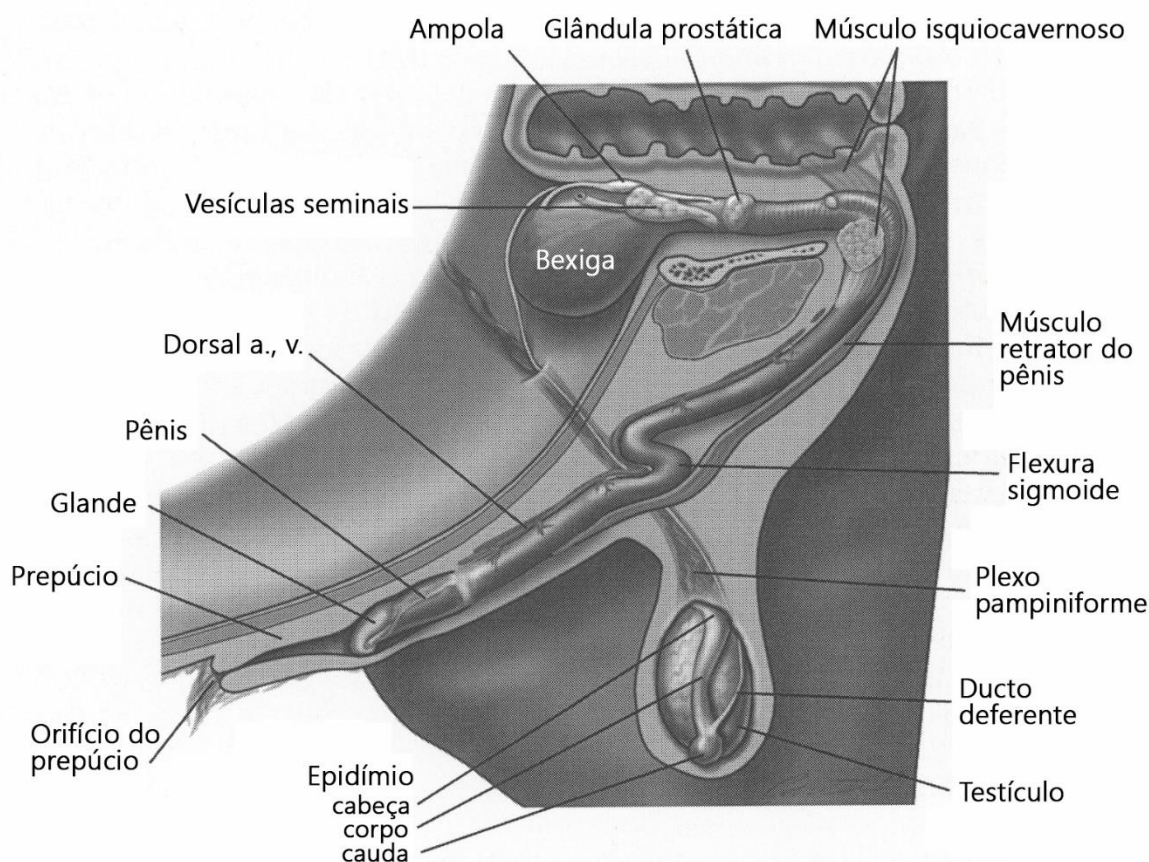
No parênquima testicular encontramos os túbulos seminíferos responsáveis pela produção de células germinativas altamente especializadas e tecido conectivo frouxo com vasos sanguíneos e linfáticos importantes para o transporte de hormônios e nutrientes para dentro e para fora do testículo. Na porção intersticial há presença de células do sistema imunológico e células de Leydig que possuem receptores de hormônio luteinizante (LH) e, quando estimuladas, hipertrofiam e produzem estrógeno e testosterona que é importante para a manutenção da espermatogênese no processo de meiose (O'DONNELL *et al.*, 2001; STAUB; JOHNSON, 2018).

A espermatogênese é o processo altamente regulado de multiplicação e diferenciação de células germinativas masculinas. Em touros o processo completo dura 61 dias e pode ser dividida em três partes: espermatocitogênese (21 dias), meiose (23 dias) e espermiogênese (17 dias) (STAUB; JOHNSON, 2018).

Nos testículos as células de Sertoli são o principal componente somático dos túbulos seminíferos e suas funções são controladas pelo hormônio folículo estimulante (FSH). Apresentam um citoesqueleto com grande plasticidade, pois se estendem desde a membrana basal dos túbulos seminíferos até a luz dos túbulos seminíferos, englobando células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento. As células de Sertoli possuem ligações rígidas entre si, estabelecendo uma barreira

hematotesticular, impedindo o trânsito livre entre os componentes do sangue e as células germinativas do compartimento adluminal, protegendo contra agentes tóxicos ou mutagênicos e, também, prevenindo reações autoimune. As células de Sertoli contribuem para a produção do fluido adluminal que é essencial para a diferenciação das células germinativas e facilitam a passagem de andrógenos e substratos energéticos como piruvato e lactato. Células de Sertoli em co-cultura com células germinativas mostraram capacidade de estimular a produção de DNA e RNA durante a mitose e meiose além de prevenirem a apoptose de espermatócitos paquítenos e espermátides arredondadas. Em bovinos, as células de Sertoli não se dividem após os 6 meses de vida e a quantidade de espermatozoides está diretamente correlacionada com a quantidade de células de Sertoli (KRETZER *et al.*, 1998; O'DONNELL *et al.*, 2001; STAUB; JOHNSON, 2018).

Figura 1 - Anatomia do sistema reprodutor masculino de touros



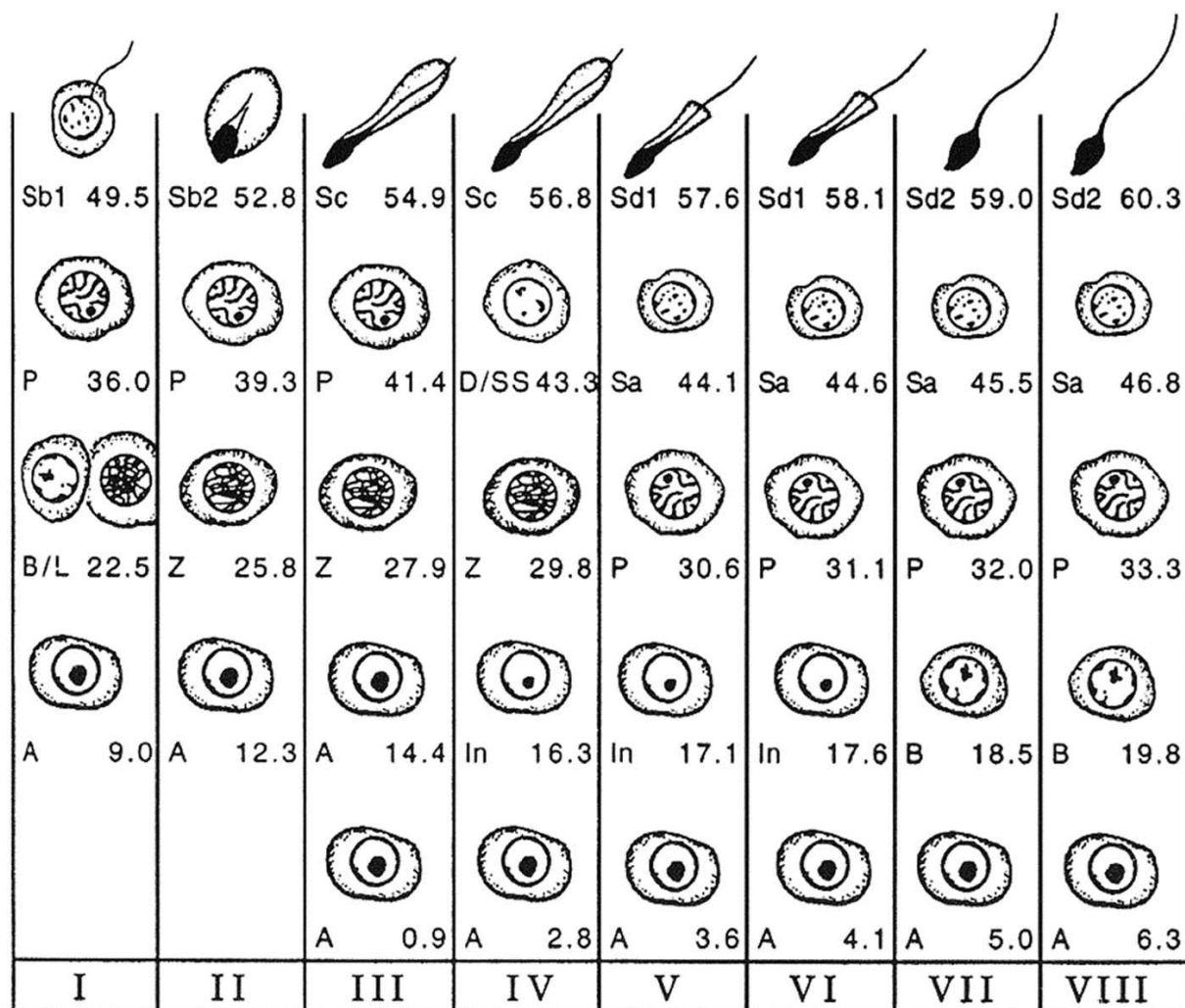
Fonte: Adaptado de Fayrer-Hosken, 1997

2.2.2 Espermatocitogênese, meiose e espermiogênese

Na espermatocitogênese, as células tronco germinativas realizam a primeira divisão mitótica, gerando espermatogônias. As espermatogônias realizam sucessivas divisões mitóticas gerando espermatócitos preleptótenos. Os espermatócitos preleptótenos iniciam a prófase da meiose diferenciando-se nos estágios leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno antes de concluir duas divisões meióticas. A primeira divisão é reducional, ou seja, o número de cromossomos é reduzido pela separação dos cromossomos homólogos e na segunda divisão ocorre a separação das cromátides irmãs. Ao final desta etapa são formadas as espermatídes haploides arredondadas (STAUB; JOHNSON, 2018).

Na espermiogênese ocorre a diferenciação das espermatídes haploides arredondadas em espermatídes com vários graus de alongamento, até finalmente o espermatozoide ser formado e liberado no lúmen dos túbulos seminíferos (STAUB; JOHNSON, 2018) (Figura 2).

Figura 2 - Diferenciação celular da célula germinativa masculina de bovinos



Fonte: Staub and Johnson, 2018

Os números em algarismo romano representam os 8 estágios do ciclo do epitélio seminífero de bovinos. A = espermatogônias do tipo A; In = espermatogônia intermediária; B = espermatogônias do tipo B; L = espermatócitos primários leptótenos; Z = espermatócitos primários zigótenos; P = espermatócitos primários paquítenos; D = espermatócitos primários diplótenos; SS = espermatócitos secundários; Sa = espermátides arredondadas; Sb1, Sb2, Sc, Sd1, Sd2 = espermátides alongadas em diferentes estágios de diferenciação. Os números abaixo de cada esquema representam os dias corridos para completar o ciclo (61 dias).

Nas fases finais da espermiogênese durante o alongamento da espermátide observa-se alterações no formato das organelas celulares como a disposição helicoidal das mitocôndrias, surgimento do axonema oriundo dos centríolos, conversão dos lisossomos em acrossomo, núcleo altamente condensado e deslocado em direção a superfície da célula, com a presença de protaminas invés de histonas. O citoplasma residual se destaca formando a gota citoplasmática (ABOU-HAILA; TULSIANI, 2000; CORNWALL, 2009; KRETZER *et al.*, 1998; O'DONNELL *et al.*, 2001).

Após a produção nos testículos, as espermátides maduras são direcionadas para o ducto eferente dos epidídimos através de uma estrutura conhecida como rete testis e precisam adquirir capacidade fertilizante, que envolve motilidade e capacidade de fertilizar um óvulo. Essas alterações ocorrem devido à exposição ao ambiente luminal do epidídimo, pois, apesar das espermátides arredondas apresentarem alto nível de transcrição, nas etapas que se seguem, a alta condensação do material genético torna-a impossível (KRETZER *et al.*, 1998; MARENGO, 2008; ZHAO *et al.*, 2019).

O DNA do espermatozoide que antes estava empacotado em histonas passa a ser empacotado por protaminas, que diminuem o volume do material genético (WARD; COVEY, 1991). Há uma abundância maior de protaminas nos espermatozoides da *cauda* do epidídimo quando comparada com o *caput* do epidídimo e com o parênquima testicular. A deficiência de protaminas está relacionada com danos no material genético espermático e pode afetar a fertilidade de touros (FORTES *et al.*, 2014). Assim, estudando a expressão gênica dos três tecidos testiculares – parênquima, caput e cauda também estamos estudando a transição de histonas para protaminas e seus mecanismos moleculares.

O RNA mensageiro (mRNA) das protaminas que substituem as histonas na organização do material genético foi transcrito previamente na espermiogênese e a manutenção da sua estabilidade para ação posterior é garantida por proteínas que reconhecem sequências específicas de nucleotídeos (*RNA-binding protein*). O epidídimo é formado por um único tubo contorcido que conecta os ductos eferentes aos ductos deferentes e é dividido pelos segmentos inicial, *caput*, *corpus* e *cauda*. Entre o seguimento inicial e a *cauda*, as células presentes modificam-se de colunar altas para cúbicas. O lúmen torna-se mais largo e mais repleto de espermatozoides. Todas as regiões do epidídimo promovem aeração, nutrição, remoção de material inservível e proteção física e bioquímica para os espermatozoides, no entanto, cada região apresenta padrões distintos de expressão gênica relacionadas a funções fisiológicas que são importantes para as diferentes etapas de maturação. No *caput* ocorre a maturação funcional dos espermatozoides e na *cauda*, a remoção dos espermatozoides em degeneração (KRETZER *et al.*, 1998; MARENGO, 2008; ZHAO *et al.*, 2019).

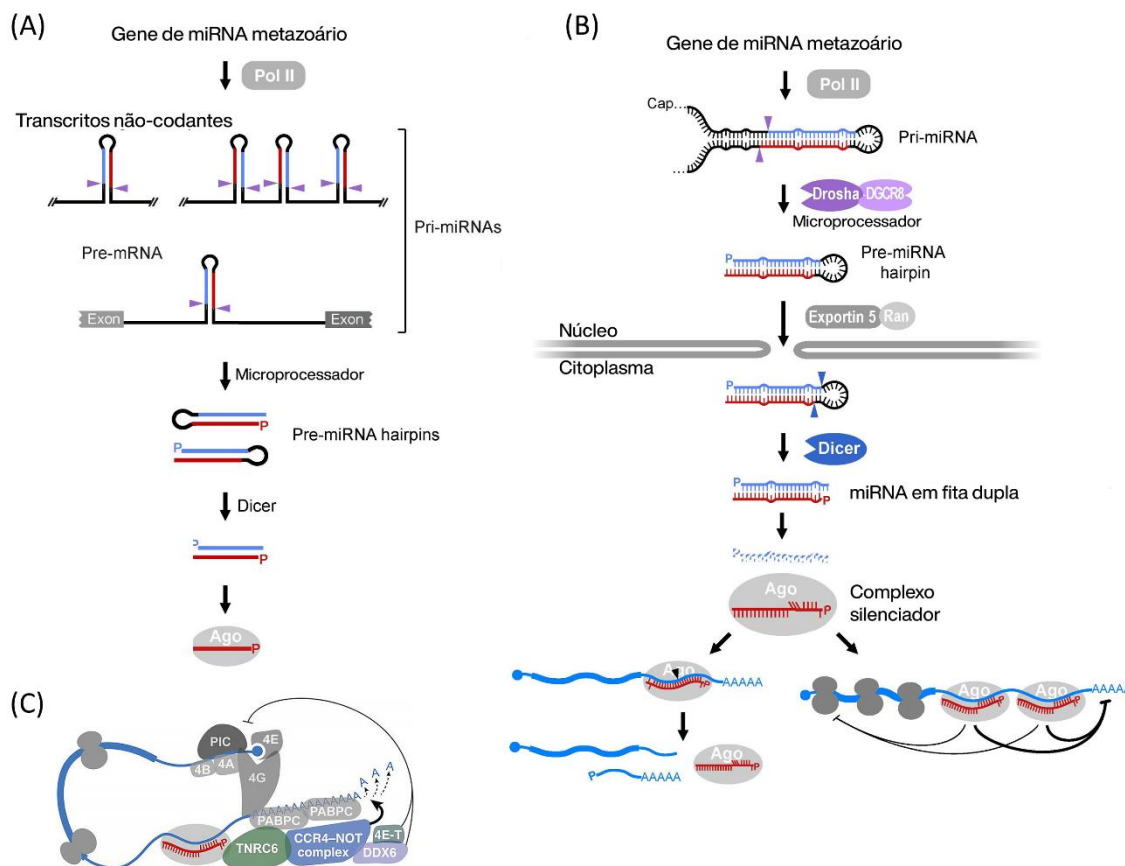
2.3 microRNAs e sua relação com a gametogênese

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs endógenos que regulam a expressão pós-transcricional dos genes. Os miRNAs possuem uma sequência de nucleotídeos que recrutam ribonucleoproteínas para formar o complexo silenciador induzido por RNA (RISC) e, posteriormente, conduzir o RISC a seu mRNA alvo (BUSHATI; COHEN, 2007; MOHR; MOTT, 2015).

A RNA polimerase II transcreve os genes de miRNA formando miRNAs primários (pri-miRNA) contendo a estrutura de capa 5' e *cauda* poliadenilada com comprimento que varia de centenas a milhares de nucleotídeos. O pri-miRNA é processado dentro do núcleo por um complexo proteico constituído pela enzima RNAase III e as proteínas Drosha e DCR8 (Pasha in moscas), que contém um domínio de ligação para RNAs em fita dupla. Este complexo cliva o pri-miRNA removendo a estrutura de capa 5' e a cauda poliadenilada, formando a estrutura secundária de grampo de cabelo (*hairpin*) com aproximadamente 70 nucleotídeos, que é transportada para o citoplasma guiado pela proteína exportin-5 para ser clivado pela enzima Dicer em interação com a proteína TRBP (Loquacious em moscas); que remove a alça do grampo de cabelo formando uma dupla de fitas de miRNA maduros com média de 22 nucleotídeos. A fita dupla de miRNA se separa; uma das fitas é degradada e a outra juntamente com a proteína TRBP e argonauta Ago2 formam o complexo RISC (BUSHATI; COHEN, 2007; MCGEARY *et al.*, 2019).

Apesar da palavra “silenciar” ser utilizada para nomear o complexo miRNA-ribonucleoproteína, sua função está mais relacionada com a diminuição da expressão gênica que com o silenciamento em si. Normalmente o microRNA liga-se ao RNA mensageiro (mRNA) do seu gene alvo através da complementaridade da sua região *seed* que compreende os seus nucleotídeos 2-8, mas também pode ligar-se através dos nucleotídeos 9 a 12, levando o mRNA do gene-alvo à degradação por hidrólise realizando clivagem na ligação fosfodiéster dos nucleotídeos. Mesmo que a complementaridade não seja completa, os microRNAs podem regular seus genes alvo (BUSHATI; COHEN, 2007; MOHR; MOTT, 2015) (Figura 3).

Figura 3 - Biogênese de miRNAs canônicos em metazoários



Adaptado de Bartel, 2018

Os miRNAs podem se originar de clusters de genes de miRNAs ou transcritos não-codantes (íntons) (a). O mecanismo de repressão guiado por miRNAs (b). O complexo silenciador recruta proteínas que levarão ao encurtamento da *cauda* poli-A do RNA mensageiro (mRNA) do gene alvo, levando-o à degradação (c).

Os microRNAs, assim como seu papel biológico, são altamente conservados evolutivamente (AMBROS, 2004; CAMPO-PAYSAA *et al.*, 2011; KABEKKODU *et al.*, 2018) e não estão restritos à regulação de genes alvo através da ligação com o mRNA. Há casos onde os miRNAs ligam-se e reprimem também a expressão de RNAs longos não-codantes (lncRNA) e, também, outros microRNAs (BUSHATI; COHEN, 2007).

Os microRNAs tem especificidade tecidual em órgãos como o cérebro e o fígado e especificidade em períodos de desenvolvimento, porém, em geral, são expressos em diferentes níveis em múltiplas células e diferentes tecidos, afetando diretamente seu efeito, uma vez que o mesmo microRNA pode ter oncogênico ou supressor de tumor dependendo da supra-expressão ou infra-expressão em tecidos diferentes além do fato de que cada microRNA pode ter centenas de genes-alvo, dificultando a identificação ou sua classificação baseada na função biológica. A

expressão dos microRNAs ocorre pelos mesmos fatores dos demais RNAs, como ativação ou inibição da transcrição, repressão epigenética e taxa de degradação (BUSHATI; COHEN, 2007; KABEKKODU *et al.*, 2018).

Em animais modelo (*Danio rerio*, *C. elegans* e *Drosophila melanogaster*) a mutação induzida de Dicer e Loquacious levou a má formações e infertilidade. (BUSHATI; COHEN, 2007) e a perda de função dos microRNAs em camundongos gerou defeitos em órgãos e tecidos do sistema nervoso, cardiovascular, musculoesquelético, digestório, excretor, endócrino, e imunológico e reprodutor masculino e feminino (BARTEL, 2018), conferindo aos microRNAs importância vital para o desenvolvimento e sobrevivência dos seres vivos. Em camundongos vários microRNAs foram identificados expressos preferencialmente ou unicamente em células de espermatócitos paquítenos, revelando que estes miRNAs não são afetados pelo processo de inativação meiótica dos cromossomos sexuais (MSC) e talvez, até participem tanto dele quanto da cromatina sexual pós-meiótica (PMSC) (SONG *et al.*, 2009).

Nos mamíferos machos os miRNAs atuam no desenvolvimento dos testículos, desenvolvimento, especificação, manutenção, pluripotência e diferenciação das células germinativas primordiais, transformação das espermatogônias em espermatócitos, diferenciação meiótica, estabilidade cromossomal e compactação da cromatina dos espermatozoides e motilidade espermática (REZA *et al.*, 2019). Há expressão de diferentes grupos de miRNAs tanto nas células de Sertoli quanto em cada tipo celular da espermatogênese (células-tronco espermatogoniais, espermatócitos, espermátides arredondadas, espermátides alongadas e espermatozoides) (CHEN *et al.*, 2017).

Os espermatozoides ganham motilidade e função acrossômica quando estão no epidídimo, onde a membrana espermática está em constante remodelação. Estas mudanças ocorrem devido a exposição ao fluido do lúmen epididimal e vesículas extracelulares como os epididiossomas, que transportam microRNAs e outros pequenos RNAs não codificantes. Em bovinos o espermatozoide adquire miRNAs progressivamente ao longo do epidídimo e tem maior expressão na cauda. Os miRNAs contidos nos epididiossomas de diferentes partes do epidídimo diferem entre si, portanto, a maturação espermática do epidídimo é resultado de interações entre diferentes secretomas epididimários específicos para cada região (SELLEM *et al.*, 2021).

2.4 Os consórcios de anotação funcional

O Projeto Genoma humano foi concluído em 2003 e mais de 99% do genoma humano foi sequenciado, no entanto, até hoje uma fração considerável do propósito biológico das sequências genômicas é desconhecida (LUO *et al.*, 2020).

The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project teve início no mesmo ano, com foco em 44 regiões genômicas específicas (que correspondiam a aproximadamente 1% do genoma humano), com objetivo de identificar todos os elementos funcionais do genoma humano. Nesta fase inicial já foi possível identificar genes codificadores de proteínas, unidades de transcrição, sítios de ligação de proteínas, elementos conservados do DNA, os fatores envolvidos na organização e modificação da cromatina e polimorfismos, além de estabelecer critérios para ampliar a cobertura completa do genoma (FEINGOLD *et al.*, 2004).

Em 2007 ocorreu uma escalada de produção do projeto e os dados produzidos foram enviados, processados e divulgados pelo *UCSC Genome Browser* (KENT *et al.*, 2002). Desde então o *The ENCODE Project consortium* tem mapeado sistematicamente regiões de transcrição, fatores de transcrição associados, estrutura da cromatina e modificação de histonas em seres humanos e camundongos (ENCODE PROJECT CONSORTIUM, 2012). O projeto é financiado pela *National Human Genome Research Institute* e possibilita novas abordagens sobre a organização dos genes e genoma e é um recurso cada vez maior de anotação funcional para pesquisas biomédicas. Os dados gerados pelo ENCODE são acessíveis gratuitamente pelo portal ENCODE (<https://www.encodeproject.org/>) oferecendo acesso irrestrito a mais de 15.000 resultados experimentais de mais de 40 tecnologias diferentes de sequenciamento de alto rendimento em mais de 75 tipos diferentes de células e tecidos. Entre os métodos para detecção de elementos reguladores do DNA são utilizados ensaios de hipersensibilidade, metilação e imunoprecipitação. Para descoberta e anotação de elementos genéticos, usa-se diversas fontes de obtenção de RNA, genômica comparativa, métodos de bioinformática e curadoria (ENCODE PROJECT CONSORTIUM, 2012).

Em 2012 o periódico *The Lancet* escreveu sobre a contribuição do ENCODE para a compreensão das funções biológicas do material genético, destacando o fato

de que, após a conclusão do sequenciamento do genoma humano, constatou-se que uma fração pequena efetivamente codificava proteínas, e, por este motivo, pensou-se que na época que a grande parte do DNA fosse considerada “lixo”. O editorial ressalta que em 10 anos os esforços do projeto foram capazes de elucidar o papel de trechos específicos e atribuir funções bioquímicas a 80% do genoma humano além de destacar o potencial terapêutico que o conhecimento oriundo da anotação funcional do genoma humano pode trazer. Atualmente o projeto está em sua fase 4 e conta com 27 grupos de pesquisa (<https://www.encodeproject.org/help/project-overview/>) nos Estados Unidos da América (EUA) (ENCODE PROJECT CONSORTIUM, 2012; THE LANCET, 2012). Os membros do consórcio ressaltam que, apesar da grande quantidade de genes humanos identificados (20.225 codificadores e 37.595 não codificadores na fase III – 2012 a 2017), a anotação funcional destes elementos ainda está em sua infância (ABASCAL *et al.*, 2020).

Apesar da disponibilidade de dados do projeto ENCODE, quando investigamos fenótipos de interesse de organismos que não são humanos ou camundongos, fazem-se necessárias informações específicas para cada indivíduo e é sabido que a anotação funcional em animais de criação é deficiente. Por este motivo, foi criado um consórcio específico para anotação em genomas de animais. O *Funcional Annotation of Animal Genomes* (FAANG) é uma ação internacional coordenada que trabalha para decifrar a relação genótipo-fenótipo em animais de produção desde 2015. O grupo padroniza ensaios básicos e protocolos experimentais, estabelece infraestrutura adequada para análise de dados além de compartilhar os dados pelo portal (<https://www.faang.org/>) de forma facilitada. Neste portal é possível encontrar informações sobre a expressão de RNA, metilação de DNA, acessibilidade, interações e modificações da cromatina. Estes mapas de anotação não se restringem à compreensão das funções do genoma, mas também tem valor na melhoria da acurácia da seleção genômica para melhoramento animal, seja através da detecção de SNPs em regiões reguladoras como variações em éxons, *enhancers*, ou regiões promotoras quanto verificando a conservação para cada nucleotídeo no genoma; seja entre espécies diferentes ou entre seres da mesma espécie. O FAANG possui colaboradores em todos os continentes e contava com 387 contribuidores em outubro de 2018. (GIUFFRA *et al.*, 2019).

Uma busca no portal (<http://data.faang.org/specimen>) em março de 2023 revelou a quantidade de registros para cada espécimes, sendo, *Sus scrofa* 19.676,

Gallus gallus 14.364, *Ovis aries* 8.350, *Capra hircus* 4903, *Equus caballus* 3.971, *Bubalus bubalis* 954, *Oncorhynchus mykiss* 393, *Salmo salar* 271, *Scophthalmus maximus* 268, *Dicentrarchus labrax* 251, *Cyprinus carpio carpio* 247, *Bos taurus* 22.008 e *Bos indicus* 347, revelando que existe uma diferença considerável na anotação do genoma entre as duas subespécies bovinas.

3 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que existem microRNAs ainda não anotados no genoma de touros *Bos indicus* com potencial para afetar características relacionadas à fertilidade.

4 OBJETIVOS

O presente estudo busca identificar e catalogar novos microRNAs em tecido testicular bovino e investigar seu possível papel na fertilidade de machos *Bos indicus*.

4.1 Objetivos específicos

1 Identificar e caracterizar os novos miRNAs destacando seus loci, quantidade, tecidos onde ocorrem e sua homologia com miRNAs já identificados em outras espécies.

2 Verificar a ocorrência dos novos miRNAs em regiões de QTL de acordo com 4 categorias: carne e carcaça, exterior e produção; leite; saúde e reprodução.

3 Realizar a predição de ligação dos novos miRNAs com genes alvos diferencialmente expressos e construir uma rede de interação para definir *hub* miRNAs.

4 Realizar o enriquecimento funcional dos genes alvo dos *hub* miRNAs que se localizam em regiões de QTLs de reprodução.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e amostras

A produção das amostras de tecido testicular de touros ($n = 5$) da raça Brahman maduros com aproximadamente 2 anos de idade ocorreu na Queensland University, Brisbane, Austrália e foi aprovada pelo Comitê de Ética (ANRFA / SCMB / 094/16). As amostras foram coletadas oportunamente logo após o abate para fins comerciais no mês de maio, fim do verão. Os tecidos apresentavam higidez, não apresentando patologias macroscópicas. Para cada touro coletadas 3 amostras sendo parênquima testicular (P), *caput* do epidídimo (CT) e *cauda* do epidídimo (CD), totalizando 15 amostras.

Cada amostra (com aproximadamente 50 mg de tecido) foi coletada em tubos Eppendorf® com 1ml de RNA*later*® (RNA stabilizing reagent, Ambion Inc., Austin, TX, United States). As amostras foram deixadas para estabilizar em temperatura ambiente durante a noite. Em seguida, o fluído RNA*later*® foi pipetado e os tubos com amostras de tecido foram armazenados em freezer a -80°C até a extração do RNA.

5.2 Extração de RNA, sequenciamento, alinhamento e preparação de bibliotecas

5.2.1 Extração

As amostras foram homogeneizadas com o sistema “*Precellys 25*” com *beads* de óxido de zircônio (Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, France). Após a homogeneização, o RNA foi extraído usando o protocolo “*RNeasy kit*” (Qiagen Pty Ltd., Melbourne, VIC, Australia). Após o tratamento com DNase usando TURBO DNase I, cada amostra foi purificada usando “*Zymo Clean e Concentrator Kit*” de acordo com as instruções do fabricante (Zymo Research, CA, United States). A concentração de RNA foi medida por espectrofotômetro “*NanoDrop ND-1000*” (Thermo Fisher Scientific®, Wilmington, DE, United States). As amostras sem a proporção ideal de 260:280, que estavam entre 1,8 e 2,1 foram excluídas do

experimento. A integridade do RNA foi verificada pelo “Agilent Bioanalyzer®” (Agilent, Santa Clara, CA, United States) e somente amostras com número de integridade de RNA (RIN) acima de 8 ($RIN > 8$) foram utilizadas para o sequenciamento. Quando necessário, a extração de RNA foi repetida para atingir essa qualidade e integridade.

5.2.2 Sequenciamento

A preparação da biblioteca e o sequenciamento de RNA foram realizados seguindo os protocolos “Illumina” padrão para a plataforma “HiSeq” (Illumina, San Diego, CA, United States). O kit de preparação da biblioteca utilizado foi o “Illumina stranded total RNA with Ribo-Zero Gold” (Illumina, San Diego, CA, United States). Os fragmentos menores de 200 nucleotídeos foram separados para o sequenciamento.

O sequenciamento “single-end” (SE) de 125 pares de base (pb) foi conduzido através de 3 *lanes* no “Illumina Hi-Seq 2000 v4 analyser” (Illumina, San Diego, CA, United States) utilizando os protocolos padrão gerando aproximadamente 60 a 100 milhões de leituras por amostra. Todas as amostras correram através de todas as *lanes* usadas para evitar algum efeito de *lane* na base de dados.

5.3 Bioinformática

5.3.1 Controle de qualidade das bibliotecas

O programa Trim Galore 0.4.5 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) foi utilizado para remover as sequências de leitura com “Phred Score” menor que 20 (<20), com comprimento menor que 15 pares de base (<15 pb) e para remover os adaptadores.

O programa FASTQC (MULTI QC) 0.11.7 (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/download.html>) foi utilizado para verificar a qualidade das sequências dos dados brutos, e após a remoção dos adaptadores e leituras de baixa qualidade. As sequências de leitura resultantes deste controle de qualidade foram utilizadas para as etapas seguintes deste estudo.

5.3.2 Identificação de novos miRNAs utilizando o pacote miRDeep2

5.3.2.1 Criação de um arquivo de genoma indexado

Utilizamos o genoma de referência ARS-UCD1.2 (http://ftp.ensembl.org/pub/release-105/fasta/bos_taurus/dna/Bos_taurus.ARS-UCD1.2.dna.toplevel.fa.gz) disponível na plataforma Ensembl (<https://www.ensembl.org/>) (CUNNINGHAM *et al.*, 2022) para os cromossomos autossômicos e o cromossomo X e a versão do genoma com o cromossomo Y adicionado disponível na plataforma The Bovine Genome Database (<https://bovinegenome.elsiklab.missouri.edu/>) (SHAMIMUZZAMAN *et al.*, 2020) para o cromossomo Y. Um arquivo com o genoma indexado foi criado a partir do arquivo do genoma de referência utilizando a ferramenta *Bowtie* (LANGMEAD *et al.*, 2009) (<http://sourceforge.net/projects/bowtie-bio/files/bowtie2/2.1.0/>) em ambiente Linux (Ubuntu 20.10).

5.3.2.2 Mapeamento das *reads* contra o genoma de referência indexado

O módulo de mapeamento (*mapper.pl*) do programa miRDeep2 (FRIEDLÄNDER *et al.*, 2012) foi utilizado para mapear as sequências de leitura no arquivo de genoma indexado. Os arquivos de sequências leitura das diferentes amostras de cada tecido foram mapeados separadamente e concatenados antes do mapeamento, sendo identificados e indicadas pelo arquivo “*config.txt*”. Para cada tecido foram criados códigos de 3 caracteres dentro do arquivo “*config.txt*”, indicando a procedência da amostra, sendo: amostras de *cauda* do epidídimo S01, S02, S03, S04, 05; *caput* do epidídimo S06, S07, S08, S09, S10 e parênquima testicular S11, S12, S13, S14, S15.

Os parâmetros de entrada utilizados foram *mapper.pl config.txt -d -e -i -j -l17 -r50 -m -p -s -t*, onde *-d* indica a entrada do arquivo “*config.txt*”, *-e* indica o formato de entrada das sequências de leitura no formato FASTQ, *-i* converte RNA para DNA, *-j* remove as sequências de leitura que apresentarem letras diferentes de ACGTN, *-l* descarta as sequências com menos de 17 nucleotídeos, *-r50* indica o número máximo (50) de loci para mapeamento no genoma de referência (YLIOJA *et al.*, 2019), *-m* comprime as sequências de leitura redundantes, ou seja, as que ocorrem mais de 10

vezes no arquivo bruto serão identificadas como `_x10` e, desta forma, diminui o tamanho do arquivo, `-p` indica o arquivo do genoma de referência indexado, `-s` indica o nome do arquivo com as sequências de leitura comprimidas que será criado com a extensão `“.fa”` e `-t` indica o nome do arquivo de mapeamento que será criado com a extensão `“.arf”`.

5.3.2.3 Identificação dos novos miRNAs

O módulo de identificação de novos miRNAs (`mirDeep2.pl`) foi executado para cada tecido separadamente, com médias em torno de 3.8 milhões de *reads* para *cauda* do epidídimo, 2.4 milhões de *reads* para *caput* do epidídimo e 4.7 milhões de *reads* para parênquima testicular em ambiente *Linux Ubuntu 20.10*, conforme exemplo: `mirDeep2.pl CD_reads_collapsed.fa ensembl_bta_genome_top_level.fa CD_vs_ensembl_bta_genome_top_level_index.arf mature_bta_ref.fa mature_other_hsa_mmu_rno.fa hairpin_bta_ref.fa -t bta 2 > report.log`; sendo `mirDeep2.pl` o módulo de identificação de novos miRNAs; `CD_reads_collapsed.fa` o arquivo de com as *reads* colapsadas de *cauda* no formato `“.fa”`; `ensembl_bta_genome_top_level.fa` sendo o arquivo do genoma de referência no formato `“.fa”`; `CD_vs_ensembl_bta_genome_top_level_index.arf` sendo o arquivo criado a partir da indexação das *reads* contra o genoma de referência; `mature_bta_ref.fa` o arquivo com as sequências de miRNA maduras de *Bos taurus* no formato `“.fa”`; `mature_other_hsa_mmu_rno.fa` `hairpin_bta_ref.fa` o arquivo com as sequências de miRNAs maduras de *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* no formato `“.fa”`; `-t bta` indica a espécie; `2 > report.log` o arquivo de log (GEBREMEDHN *et al.*, 2015; YLIOJA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2017).

Os dados de sequências de miRNAs primários de bovinos e sequências maduras de bovinos *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* foram obtidas do portal miRBase (GRIFFITHS-JONES, 2004, 2006; GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2008; KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019; KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2011, 2014) (Release 22.1: outubro de 2018) e extraídas dos arquivos `mature.fa.gz` e `haipin.fa.gz`.

Os miRNAs primários preditos novos que não apresentaram correspondência com miRNAs conhecidos do miRBase, apresentaram `mirDeep2 score` maior que 4, *p*-valor significativo para estabilidade da estrutura de dobra, contagem de *reads*

5.3.3 Caracterização dos loci dos novos miRNAs

A plataforma *UCSC Genome Browser* (KAROLCHIK; HINRICHS; KENT, 2011) foi utilizada para verificação dos loci de ocorrência dos novos miRNAs através das coordenadas genômicas. Para os miRNAs que ocorreram em regiões intrônicas foram anotados o símbolo e descrição dos genes onde estes miRNAs estão inseridos. Para a descrição dos genes foram utilizadas as informações da plataforma *UCSC Genome Browser*, *National Center for Biotechnology Information - NCBI* (SAYERS *et al.*, 2022) e *Ensembl* (CUNNINGHAM *et al.*, 2022).

5.3.4 Similaridade dos novos miRNAs com miRNAs anotados de outras espécies

Para verificar a similaridade dos novos miRNAs identificados com miRNAs conhecidos em outras espécies utilizamos como entrada as sequências maduras dos novos miRNAs nas plataformas NCBI Nucleotide BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) com os parâmetros Program: BlastN, Database: NCBI Transcript Reference Sequences (refseq_rna), Species: *Bos taurus* (taxid 9913), *Homo sapiens* (taxid 9606), *Mus musculus* (taxid 10090) e *Rattus norvegicus* (taxid 10116) e ENSEMBL (CUNNINGHAM *et al.*, 2022) com os parâmetros: DNA, Ensembl Non-coding RNA genes, BLAST N, Short sequences, espécies: Cow, Human, Rat, Mouse reference.

Para garantir acurácia consideramos a cobertura de 100% das sequências de miRNAs maduros e e-valor < 1 . O e-valor indica a estatística de uma única correspondência de alinhamento no banco de dados, desta forma quanto menor um e-valor, mais significativa é a correspondência. Os resultados com 100% de cobertura e e-valor < 1 apontados nas duas plataformas foram considerados confiáveis.

5.3.5 Ocorrência dos novos miRNAs em regiões de QTL

Para verificar a ocorrência das novas sequências de miRNAs em regiões de QTL utilizamos os dados disponíveis na plataforma AnimalQTLdb (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index>) (HU; PARK; REECY, 2022) e utilizamos um *in house* script em Python 3.0 para comparar a posição das coordenadas genômicas dos novos miRNAs com as coordenadas genômicas das QTLs.

5.3.6 Predição de ligação dos novos miRNAs com genes alvo diferencialmente expressos entre os 3 tecidos

A predição de ligação dos novos miRNAs com seus prováveis genes alvo foi realizada utilizando os programas *RNAhybrid* (KRÜGER; REHMSMEIER, 2006) com os parâmetros *-b1 -c -s 3utr_human -e -20 -m 20.000* onde *-b* indica o número de hits, *-c* indica formato compacto de saída, *-s* indica a estimativa aproximada do p-valor para a sequência alvo e *-m* indica o comprimento máximo do alvo e o *TARGETSCAN* (AGARWAL *et al.*, 2015; MCGEARY *et al.*, 2019) com parâmetros padrão.

Com o intuito de identificar genes alvo potencialmente mais relevantes na regulação de tecidos testiculares de touros, os 3442 genes diferencialmente expressos (DE) previamente identificados em um estudo anterior (LIMA *et al.*, 2021) realizado pelo mesmo grupo com os mesmos animais e tecidos foram utilizados nessa análise.

As sequências de mRNA dos genes-alvo DE foram obtidas através da ferramenta *Ensembl BioMart* (CUNNINGHAM *et al.*, 2022) com os parâmetros Database: *Ensembl Genes 106*, Dataset: *Cow genes ARS-UCD1.2*.

Para aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos consideramos apenas os genes alvo preditos comuns entre os dois programas.

5.3.7 Criação de rede de interação entre os novos miRNAs e seus genes alvo

O programa *Cytoscape* (SHANNON *et al.*, 2003) foi utilizado para a criação de uma rede de interação entre os novos miRNAs e seus genes alvo. Os *hub* miRNAs foram definidos como os miRNAs com mais ligações a genes alvo que a média mais 1x o desvio padrão da média do número de genes alvo e que ocorreram em regiões de QTL relacionadas a reprodução.

5.3.8 Enriquecimento funcional

Os genes alvo dos 10 *hub* miRNAs identificados na análise anterior e que ocorrem em regiões de QTL relacionadas a reprodução foram submetidos ao enriquecimento funcional através da plataforma *g:Profiler*

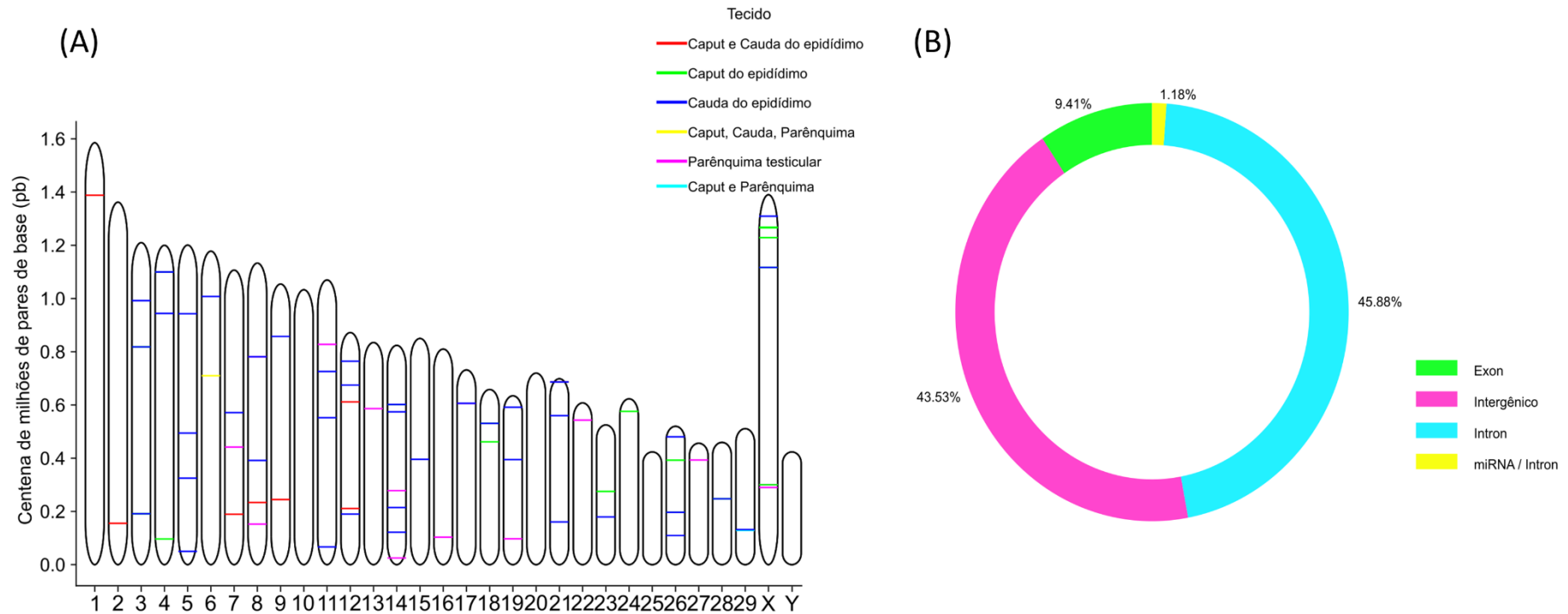
(<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) (RAUDVERE *et al.*, 2019) no módulo g: buscando por função molecular, componentes celulares, processos biológicos e *KEGG pathways* com método de corte significativo padrão g_SCS com p-valor 0.05. A descrição dos termos de ontologia foi obtida através do portal EMBL's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>). A descrição das vias enriquecidas dos 10 *hub* miRNAs foi obtida através do portal KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg/>) (KANEHISA *et al.*, 2021).

6 RESULTADOS

6.1 Identificação de novos miRNAs

Dos 29 cromossomos autossomos e 2 sexuais, foram identificados novos miRNAs em 27 cromossomos (Figura 5a). A análise das regiões genômicas onde os novos miRNAs ocorreram indicaram que 89,41% ocorreram em regiões intergênicas ou intrônicas (Figura 5b). Identificamos um total de 415 novos miRNAs utilizando o pacote miRDeep2 e, após a aplicação dos filtros previamente descritos obtivemos um total de 85 novos miRNAs (Tabela 1) (Figura 6a) sendo 74 ocorrendo em um único tecido, 10 ocorrendo em dois tecidos e 1 ocorrendo em três tecidos (Figura 6b).

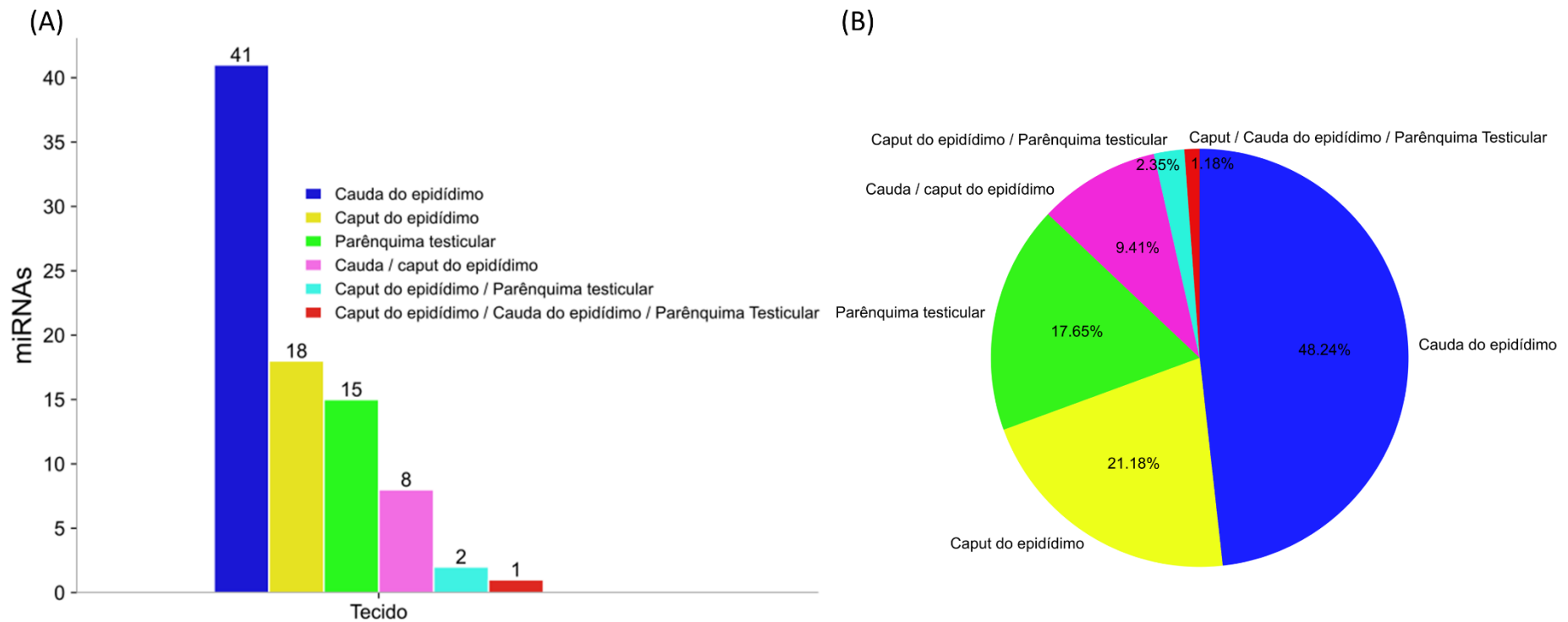
Figura 5 - Caracterização e distribuição dos novos miRNAs



Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico de indicando os loci de ocorrência dos novos miRNAs por cromossomo e por tecido (A) e gráfico de rosca com a porcentagem de miRNAs por região cromossômica (B).

Figura 6 - Distribuição dos novos miRNAs por tecido



Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico de barras indicando a distribuição de novos miRNAs por tecido em quantidade (A) e gráfico de setores com a correspondência em porcentagem (B).

Tabela 1 - Novos miRNAs identificados em tecido testicular bovino de touros *Bos indicus*

(continua)

BTA	Id provisória	Sequência do precursor	Sequência madura	Tecido	Coordenada genômica
1_138819324..138819399 1 :+		agagaugaagcacuggagc augaccagcagggaguc cugcugcugcuuucuccuc gcugcuuccauuucaga	agagaugaagcacugg agc	<i>Caput, Cauda</i> do epidídimo	1:138819324-138819399:+
2_15532578..15532636:+		aaaaguuuuguuuggguuuc ucugcaaaauguuauuggaa aaacaugaaugaauuuuu g	aaaaguuuuguuuggg uuucucu	<i>Caput, Cauda</i> do epidídimo	2:15532578-15532636:+
3_3_679		caaaaaguucuuuugaguu uuuccauaaaaugucgcag aaaaaccagaaugaacu ug	aaaaaccagaaugaac uuuug	<i>Caput</i> do epidídimo	3:19138428-19138487:+
3_3_841		aaaaguucuuuugaguuuu uccauaaaaugucgcagaa aaaccagaaugaacu uuug	aaaaaccagaaugaac uuuug	<i>Cauda</i> do epidídimo	3:19138430-19138487:+
3_3_784		aaaaaguuuuguucgaguuu uucccuuaacacuguaugg aaaaaucugaaugaacu uuu	aaaaaguuuuguucgag uuuuucc	<i>Caput</i> do epidídimo	3:81836682-81836742:+
3_3_950		aaaaaguuuuguucgaguuu uucccuuaacacuguaugg aaaaaucugaaugaacu uuug	aaaaaguuuuguucgag uuuuucc	<i>Cauda</i> do epidídimo	3:81836682-81836743:+

(continuação)					
BTA	Id provisória	Sequência do precursor	Sequência madura	Tecido	Coordenada genômica
3	3_969	ucuagucucugaggugcccu cugcuggguggcagagagc aggugaugaugaggucuga gc	aggugaugaugagguc ugagc	Cauda epidídimo	do 3:99218009-99218069:+
3	3_971	ucuagucucugaggugcccu cugcuggguggcagagagc aggugaugaugaggucuga gc	aggugaugaugagguc ugagc	Cauda epidídimo	do 3:99250539-99250599:+
4	4_1052	agaguucccugaacagcaa ggaauauucagggauugauc uccuugcuguccagggacu cuca	agaguucccugaacag caagga	Caput epidídimo	do 4:9646179-9646241:+
4	4_1522	caaaaaguuuguuuuggguu uuucuguaagaugugcaaa agcucaaaugaccuuuuug ac	caaaaaguuuguuuugg guuuuu	Cauda epidídimo	do 4:94400857-94400916:-
4	4_1168	aaaaaguuuguucgaguuu uucuauagauuauuuuuu uuauaggacaaacccgaac aaacuuuuugg	aaaaaguuuguucgag uuuuuc	Caput epidídimo	do 4:109988255-109988323:+
4	4_1420	aaaaaguuuguucgaguuu uucuauagauuauuuuuu uuauaggacaaacccgaac aaacuuuuuggc	aaaaaguuuguucgag uuuuuc	Cauda epidídimo	do 4:109988255-109988324:+
5	5_1575	aagaaguuuguuuuggguu uuccauaauaucuugcagc aaaacccgaaugaacuuuu ggg	aaaacccgaaugaacu uuuggg	Cauda epidídimo	do 5:4986904-4986964:+

(continuação)

BTA	Id provisória	Sequência do precursor	Sequência madura	Tecido	Coordenada genômica
5	5_1621	cugggcaacaaggugaggu gcccgccucgauccgugca ucuguggggcaggcagucc aguuuucccagga	guccaguuuucccagg a	Cauda do epidídimo	5:32495658-32495729:+
5	5_1643	caaaaaguucauuuuggguu uuuccauagaucuuacagg aagacccgaaugaacuuiu uga	aagacccgaaugaacu uuuuga	Cauda do epidídimo	5:49441420-49441480:+
5	5_1992	aaaaaguucgucgaguuu uucuguaacaucuuagga aaaacccgaaugaaccuuu u	aagacccgaaugaacu uuuuga	Cauda do epidídimo	5:94298698-94298756:-
6	6_70996242..70996302:+	caaaaaguucguccagauu uuuguaauuuuuuaggaa aaacccaaacaaauuuuu ggc	caaaaaguucguccag auuuuu	Caput, Cauda, Parênquima Testicular	6:70996242-70996302:+
6	6_2271	aaauuucauucagguuuu cguaacagcugaugaaaag ccugaaggaacuuiuuu	aaaagccugaaggaac uuuuu	Cauda do epidídimo	6:100775517-100775571:+
7	7_18947021..18947082:+	aaaagguucauucggguuu uucuguaauaccuuacgga aaaaacccgaacaaacuui uugg	aaaacccgaacaaacu uuuugg	Caput, Cauda do epidídimo	7:18947021-18947082:+
7	7_6019	ucugccagggauccagagaa gagaccugaaggggcucuu cucugaucccuggcagaga	cuucucugaucccugg cagaga	Parênquima Testicular	7:44175748-44175805:+
7	7_2774	caaaaauuucuuuagguu uuucugucagaugguagg aaaaacccgaaugaacuui ggga	aaaaacccgaaugaac uuuggga	Cauda do epidídimo	7:57130381-57130442:-

(continuação)

BTA	Id provisória	Sequência do precursor	Sequência madura	Tecido	Coordenada genômica
8	8_6850	gggaaagaagauacucugg aguaggaaauggcaaccca cuccagauuucuugccug	acuccagauuucuugc cug	Parênquima Testicular	8:15222571-15222627:+
8	8_23350616..23350672:+	aacguuuguuuuggguuuuu cuauaacaucuuauaggaaa gacccgaaugaacuuiuug	aaagacccgaaugaac uuuug	Caput, Cauda do epidídimo	8:23350616-23350672:+
8	8_3031	aagaaguucguucagguuu uuccauaucuuacaaaaaa cccugaaggaacuuiuug	aaaaccugaaggaac uuuuug	Cauda do epidídimo	8:39157297-39157353:+
8	8_7305	caaaaguuuuguuuggguuu uuccaucaaauguuacgga aaaacacgaacaaacuuiu gggc	aaaacacgaacaaacu uuugggc	Parênquima Testicular	8:78118822-78118883:+
8	8_3069	aaaaguuuuguuuggguuu uccaucaaauguuacggaa aaacacgaacaaacuuiu ggcc	aaaaguuuuguuuggg uuu	Cauda do epidídimo	8:78118823-78118884:+
9	9_24479804..24479866:-	uccaggauaugugcgugua acucuauuugaaguugug ggggucacauacauauccu agggc	uccaggauaugugcgu guaacuc	Caput, Cauda do epidídimo	9:24479804-24479866:-
9	9_3582	aaaaguguguucgggcuuu uccacuauaucgcauggaa aaccagaaggaacuuiuug	gaaaaccagaaggaac uuuuug	Cauda do epidídimo	9:85769023-85769080:-
11	11_4277	aaaauucuuuuggauuuuu ccauuauaucuuauaggaaa aaccgaaugaacuuiu	aaaaaccgaaugaac uuu	Cauda do epidídimo	11:6658957-6659011:+

(continuação)

BTA	Id provisória	Sequência do precursor	Sequência madura	Tecido	Coordenada genômica
11	11_4355	caaaaaguuuuuuggguu uuucuguaagauggugcag aaaaacccgaaagaacuuu uu	caaaaaguuuuguuugg guuuuu	Cauda do epidídimo	11:55224988-55225047:+
11	11_4620	ucgguuuuugccccaugcgu uggaagacuuccccaaccgc gaguggcugaaccuug	aaccgcgagugggcuga accuug	Cauda do epidídimo	11:72585221-72585277:-
11	11_10650	uaaaacuugugaacuguuu auuucuggaanguuccauu ucauguuuuugga	uaaaacuugugaacug uuuauuuc	Parênquima Testicular	11:82781533-82781584:+
12	12_4952	aaaaaguucuuuuggguuu cuccauaucuaacagaa aagccugaaugaacucuuu gg	aaagccugaaugaacu cuuugg	Cauda do epidídimo	12:19002097-19002157:-
12	12_21090260..21090309: +	gccugguuuaggcuguuug cccugagccaguccaguuu ucccaggaau	guccaguuuucccagg aau	Caput, Cauda do epidídimo	12:21090260-21090309:+
12	12_61147642..61147701:-	aaaaaguuuuauucagguuc uuccuuuagauguuugga aaaaccagaaugaacuuuu ga	aaaaaccagaaugaac uuuuga	Caput, Cauda do epidídimo	12:61147642-61147701:-
12	12_5002	gaaaguucuuucgagucuu ucauacaauuuuaggaaa aaccuaaugaacuuiuug	aaaaaccuaaugaac uuuug	Cauda do epidídimo	12:67485446-67485502:-
12	12_4895	aaaaaguucguuuggguuu uucuguaucagcauugga aaaaccugaaggaaguuuu ugaa	aaaaaccugaaggaag uuuuugaa	Cauda do epidídimo	12:76450436-76450497:+

(continuação)

BTA	Id provisória	Sequência do precursor	Sequência madura	Tecido	Coordenada genômica
13	13_13432	ucuuaguuuuccgacaagg gaucaacccaugccccugc aguagaaauguggagucuu aaccuc	aauguggagucuuaac cuc	Parênquima Testicular	13:58632437-58632501:-
14	14_14106	acugcucuagccuagggcuu cccucguggcucagauggua aagaaucugccuacaauugc agaagaccugagcucuaucc cuggguugggaagauc	ucccuggguugggaag auc	Parênquima Testicular	14:2509631-2509726:-
14	14_5439	aaaaguuuuucagguuuu uucguaacauguuacagaa aaacccgaaugaacuauuu g	aaaaacccgaaugaac uauuug	Cauda do epidídimo	14:12182125-12182183:+
14	14_5481	aaaguucuuuugggguuuc ccauacuagccaauuggaaa accccgaaugaacuuuuu	aaaaccccgaaugaac uuuuu	Cauda do epidídimo	14:21455925-21455981:+
14	14_13966	uaagacuuggguuagaaca ugggcucuaacauggguua gaacuuggguuaguccuau gcucugaaaguguuagu	uaagacuuggguuaga aca	Parênquima Testicular	14:27819212-27819286:+
14	14_5624	cguucaguugcuagguugu gucgagugcuaagucgacu cugccagccccuggacugc	cucugccagccccugg acugc	Cauda do epidídimo	14:57425472-57425529:-
14	14_5626	aagauucauucagguuuuu ccuaacagcuuauuggaaaa acccgaaugaaccuuuuu	aaaaacccgaaugaac cuuuu	Cauda do epidídimo	14:60189570-60189625:-
14	14_4742	aaaagguucauucggguuu uuccauaagcuguuaggaa aaaccugaaugaauuuuu	aaaagguucauucggg uuuuuc	Caput do epidídimo	14:60189570-60189627:+

(continuação)

BTA	Id provisória	Sequência do precursor	Sequência madura	Tecido	Coordenada genômica
15	15_5852	aguucauuagcauuuuucu auaagauguuauuggaaaaa cccgaaugaacuuiu	aaaaacccgaaugaac uuu	Cauda epidídimo	do 15:39578294-39578346:-
16	16_16073	ucccucaugaugguucaaca ggacagaaacagccaacucc agccagcccuccugucacag auaaccucauggggcugc agc	ucccucaugaugguuc aacaggaca	Parênquima Testicular	16:10308480-10308562:-
17	17_6498	gaugaggcucagcgagcccu gguccugugucugauuccc agggcucgcugagccucauc u	gaugaggcucagcgag cccugg	Cauda epidídimo	do 17:60624771-60624832:+
17	17_16492	ugaggcucagcgagcccugg ucccugugucugauucccag ggcucgcugagccucauc	ugaggcucagcgagcc cuggucc	Parênquima Testicular	17:60624773-60624831:+
18	18_6137	aaaaguucguuuggguuuu uccaugccauccucaggaaa cccugaacgaacuuiu	aaaaguucguuugggu uuuucc	Caput epidídimo	do 18:46149392-46149447:+
18	18_6318	caaaaaguuuuguuuggguu uuuccaggagauguuacgg aaaaccccgaaugaacuuiu uuggccaacc	caaaaaguuuuguuugg guuuuu	Caput epidídimo	do 18:53071208-53071275:-
18	18_7286	caaaaaguuuuguuuggguu uuuccaggagauguuacgg aaaaccccgaaugaacuuiu uu	caaaaaguuuuguuugg guuuuu	Cauda epidídimo	do 18:53071216-53071275:-
19	19_20108	acuccaguauucuugccugg gaaacccauggacagaag acagaagaaccugg	acuccaguauucuugc cug	Parênquima Testicular	19:9719247-9719300:-

(continuação)

BTA	Id provisória	Sequência do precursor	Sequência madura	Tecido	Coordenada genômica
19	19_7768	aaaguuguucgauucugu ccaauaaccuauaggaaa accccgaaugaacuuuuu	aaaaccccgaaugaac uuuuu	Cauda epidídimo	do 19:39481563-39481619:-
19	19_7870	aaaaguucauuugaguuuu cccuaauauguuuaggaa aaacccgaaggaacuuuuu a	aaaaacccgaaggaac uuuuua	Cauda epidídimo	do 19:59160118-59160176:-
21	21_8598	agaguucauccgggucuccc cauaagaugcugcagaaaa acccggaugaacuuuuu	aaaaacccggaugaac uuuuu	Cauda epidídimo	do 21:16052251-16052307:-
21	21_8331	aguucauuugguuuuuucc auaagaugguacaaaaaa cccgaugaacuuu	aaaaacccgaaugaac uuu	Cauda epidídimo	do 21:56006118-56006170:+
21	21_68645104..68645164:-	agugguccuaaaacauuuc caauugcgcuacagaacug uugaacuguuaagaaccac ugg	uugaacuguuaagaac cacugg	Caput, Parênquima Testicular	21:68645104-68645164:-
21	21_8692	uagugguccuaaaacauuuc acaauugcgcuacagaacu guugaacuguuaagaacca cugg	uugaacuguuaagaac cacugg	Cauda epidídimo	do 21:68645104-68645165:-
21	21_22317	cagugguucuuacaguuc aacaguucuguagcgcaau ugugaaauguuuaggacca cuaga	gugaaauguuuaggac cacuaga	Parênquima Testicular	21:68645105-68645167:+
21	21_68645106..68645167: +	agugguucuuacaguuca acaguucuguagcgcauu gugaaauguuuaggaccac uaga	gugaaauguuuaggac cacuaga	Caput, Cauda do epidídimo	21:68645106-68645167:+

(continuação)

BTA	Id provisória	Sequência do precursor	Sequência madura	Tecido	Coordenada genômica
22	22_23568	uucacuggagaagguacuu ggcuccuagaggguuucu cugugaccaagguuuuuccc aaguguggc	uucacuggagaaggua cuugggcucc	Parênquima Testicular	22:54312189-54312256:+
23	23_9131	aaaagauucauuccuuuuu ucccauaguaucuuuugga aaaacccgaaagaacuuuu gg	aaaaacccgaaagaac uuuugg	Cauda epidídimo	do 23:17918866-17918925:+
23	23_8301	ccuggagagagcugauaaa acuugcgguuaguccgug agaacagcuuccgcagacc	ccuggagagagcugau aaaacuugc	Caput epidídimo	do 23:27522689-27522746:-
24	24_8649	uuuagugugauaauuggcgu uugauaguuuggacacaaa caccuugucacacuccaca	uuuagugugauaauug gcguuug	Caput epidídimo	do 24:57588150-57588208:-
26	26_10166	agaucacagccuguagaau aaagaugauagucaaauc ugacagacuggagucuga	auucugacagacugga gucuga	Cauda epidídimo	do 26:10928073-10928129:-
26	26_10083	aaaaguucauuggauucuu cuguaacauccuauuggaaa aaccagaaggaacuuuuug	aaaaaccagaaggaac uuuuug	Cauda epidídimo	do 26:19659550-19659607:+
26	26_8883	aaaguucauuggauucuu uguaacauccuauuggaaa accagaaggaacuuuuu	aaaaaccagaaggaac uuuuu	Caput epidídimo	do 26:19659551-19659606:+
26	26_8980	auugaaggcuauuagcag uauaacuaauaguaauac ugccagucuccuucagaca	uacugccagucuccuu cagaca	Caput epidídimo	do 26:39258201-39258258:-
26	26_10146	aaaaguuuuguuuggguuag ucuguaagauguuauuggaa aaacacuaacgaauuucuu g	aaaaguuuuguuuggg uu	Cauda epidídimo	do 26:48037431-48037489:+

(continuação)

BTA	Id provisória	Sequência do precursor	Sequência madura	Tecido	Coordenada genômica
27	27_27890	agcguugccuguggccaug gggcagagccuccaaacaag gagauguccccacgguggcc ucugggaacacugu	uggccucugggaacac ugu	Parênquima Testicular	27:39312401-39312474:-
28	28_9211	guucucuaaugcucugccgc aucaggaacuuguucguga ugcggguagagcaucagaga acu	ugcggguagagcaucag agaacu	Caput epidídimo	do 28:24750916-24750977:+
28	28_10463	uucucuaaugcucugccgca ucaggaacuuguucgugau gcgguagagcaucagagaa cu	ugcggguagagcaucag agaacu	Cauda epidídimo	do 28:24750917-24750977:+
29	29_12872752..12872814: +	ucugagagacgugaccuug uuuuguucaaccagacucc aaaacaagaucacgucucuc aga	ucugagagacgugacc uuguuu	Caput, Parênquima Testicular	29:12872752-12872814:+
29	29_10810	aaaguuugaguuuuuucca uaacaucccauggaaaaccc cgaaugaacuuuuu	aaaaccccgaaugaac uuuuu	Cauda epidídimo	do 29:13181092-13181145:-
X	X_30184	ugcgcagacaggugcuuuu cacuuaaacucagugaaag gaccugccuggguag	ugaaaggaccugccug gguag	Parênquima Testicular	X:28996246-28996299:-
X	X_9878	uacuccagagggugucauu cagguaaacuaaagcaugu cugucaccuucuugagugg a	ucugucaccuucuuga gugga	Caput epidídimo	do X:30015440-30015498:-
X	X_30192	uacuccagagggugucauu cagguaaacuaaagcaugu cugucaccuucuugagugg	ucugucaccuucuuga gugg	Parênquima Testicular	X:30015441-30015498:-

(conclusão)					
BTA	Id provisória	Sequência do precursor	Sequência madura	Tecido	Coordenada genômica
X	X_11288	aaaaguuc <u>au</u> uggggc <u>uuu</u> uccauaugaugcuacagaa aaaccagaaggaacuuuuu g	aaaaaccagaaggaac uuuuug	Cauda epidídimo	do X:111709012-111709070:-
X	X_9968	aaaguuc <u>au</u> uggggc <u>uuu</u> ccauaugaugcuacagaaa aaccagaaggaacuuuuu	aaaaaccagaaggaac uuuuu	Caput epidídimo	do X:111709013-111709069:-
X	X_9776	aaaagu <u>uu</u> guuuuggguuuc ucuguaggaucauauuggaa aaaccugaaggaacuuuuu	aaaaaccugaaggaac uuuuu	Caput epidídimo	do X:122902225-122902282:+
X	X_9795	gcccacgggaagaauacgg gcaaguc <u>aa</u> accu <u>aa</u> uuuu uggaggucu	cuaauuuuuggagguc u	Caput epidídimo	do X:126568995-126569042:+
X	X_9984	gcccacgggaagaauacgg gcaaguc <u>aa</u> accu <u>aa</u> uuuu uggaggucu	cuaauuuuuggagguc u	Caput epidídimo	do X:126586037-126586084:-
X	X_9801	gaaaguuc <u>gu</u> uuuggguuuu uccauca <u>aa</u> uguuauagaa aaaccugaaggaauuuuuu uu	aaaaaccugaaggaau uuuuuuu	Caput epidídimo	do X:126805613-126805672:+
X	X_11104	aaaagu <u>uu</u> guuuuggguu <u>aa</u> ucuguacc <u>au</u> cuuauuggaa aaucugaac <u>aa</u> acuuuau g	aaaagu <u>uu</u> guuuuggg uu	Cauda epidídimo	do X:130931018-130931076:+

Fonte: Elaborado pelo autor

6.2 Similaridade entre novos miRNAs identificados em bovinos e miRNAs anotados em espécies conhecidas

Verificamos similaridade entre 14 novos miRNAs preditos e 19 miRNAs anotados em outras espécies totalizando 12 ocorrências em *Bos taurus*, 10 ocorrências em *Homo sapiens*, 5 ocorrências em *Mus musculus* e 6 ocorrências em *Rattus norvegicus* (Tabela 2).

Houve similaridade entre mais de um dos 14 novos miRNAs e os 19 miRNAs anotados em outras espécies, portando, considerando apenas resultados únicos temos 8 miRNAs anotados em *Bos taurus*, 5 em *Homo sapiens*, 4 em *Mus musculus* e 2 em *Rattus norvegicus*. Todos os 14 novos miRNAs ocorreram em regiões de QTL (Tabela 3).

Tabela 2 - Quantidade de novos miRNAs bovinos com similaridade com miRNAs anotados em outras espécies

Tecido	<i>Bos taurus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Cauda</i> do epidídimo	3	3	1	2
<i>Caput</i> do epidídimo	6	2	1	0
Parênquima testicular	0	2	1	1
<i>Cauda / caput</i> do epidídimo	2	3	2	2
<i>Caput</i> do epidídimo / Parênquima testicular	0	0	0	1
<i>Caput</i> do epidídimo / <i>Cauda</i> do epidídimo / Parênquima Testicular	1	0	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3 - Alinhamento BLAST das sequências maduras dos novos miRNAs preditos contra o genoma de outras espécies e as categorias de QTL correspondentes às coordenadas genômicas

(continua)

Id provisória	<i>Bos taurus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	QTL
24_8649	<i>MIR122</i>	<i>MIR3591</i> <i>MIR122</i>	<i>Mir122</i>		Carne, carcaça, produção e saúde
14_4742	<i>MIR2285BE</i>				Carne, carcaça, produção e saúde Leite Reprodução
18_6318	<i>MIR2285BS</i> <i>MIR2285CM</i> <i>MIR2285Y</i>				Carne, carcaça, produção e saúde Leite Reprodução
3_784	<i>MIR2285N-7</i>				Carne, carcaça e produção Reprodução
21_68645104..68645164:-				<i>Mir3545</i>	Carne, carcaça, produção e saúde Leite Reprodução

(continuação)

Id provisória	<i>Bos taurus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	QTL
21_8692		<i>MIR203B</i> <i>MIR203A</i>		<i>Mir3545</i>	Carne, carcaça e saúde
5_1621		<i>MIR145</i>	<i>Mir145b</i>	<i>Mir145</i>	Carne, carcaça, produção e saúde Leite
4_1522	<i>MIR2285BS</i> <i>MIR2285CM</i> <i>MIR2285Y</i>				Carne, carcaça, produção e saúde Leite
2_15532578..15532636:+	<i>MIR2285Y</i>				Carne, carcaça e produção Leite
7_18947021..18947082:+	<i>MIR2284F</i>				Carne, carcaça, produção e saúde Leite Reprodução
21_68645106..68645167:+		<i>MIR203B</i> <i>MIR203A</i>	<i>Mir203</i>	<i>Mir3545</i>	Carne, carcaça e saúde
12_21090260..21090309:+		<i>MIR145</i>	<i>Mir145a</i>	<i>Mir145</i>	Carne e carcaça

					(conclusão)
Id provisória	<i>Bos taurus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	QTL
6_70996242..70996302:+	MIR2285AA				Carne, carcaça, produção e saúde Leite Reprodução
21_22317		MIR203B MIR203A	Mir203	Mir3545	Carne, carcaça e saúde

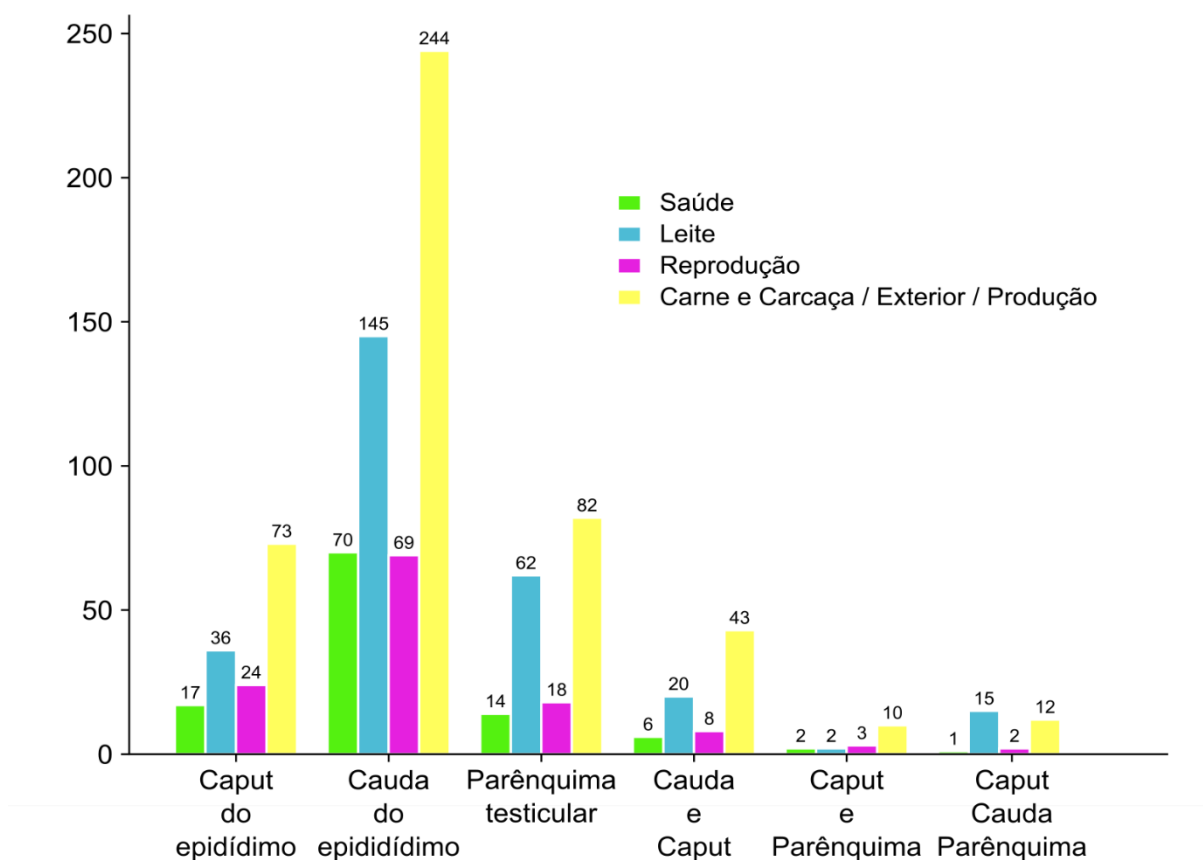
Fonte: Elaborado pelo autor

6.3 Ocorrência de novos miRNAs bovinos identificados em regiões de QTL

Dos 85 novos microRNAs identificados 72 ocorreram em 978 regiões de QTL distribuídas em 4 categorias sendo 124 destas ocorrências em regiões de QTL associadas à reprodução (Figura 7a).

As regiões de QTL com a maior porcentagem de ocorrências (47,44%) foram as relacionadas a carne, carcaça, exterior e produção. Um total de 60 novos miRNAs (Tabela 4) ocorreram em regiões relacionadas com fertilidade e reprodução (12,68%) (Figura 8a). Estas ocorrências foram distribuídas em 16 características (Figura 8b).

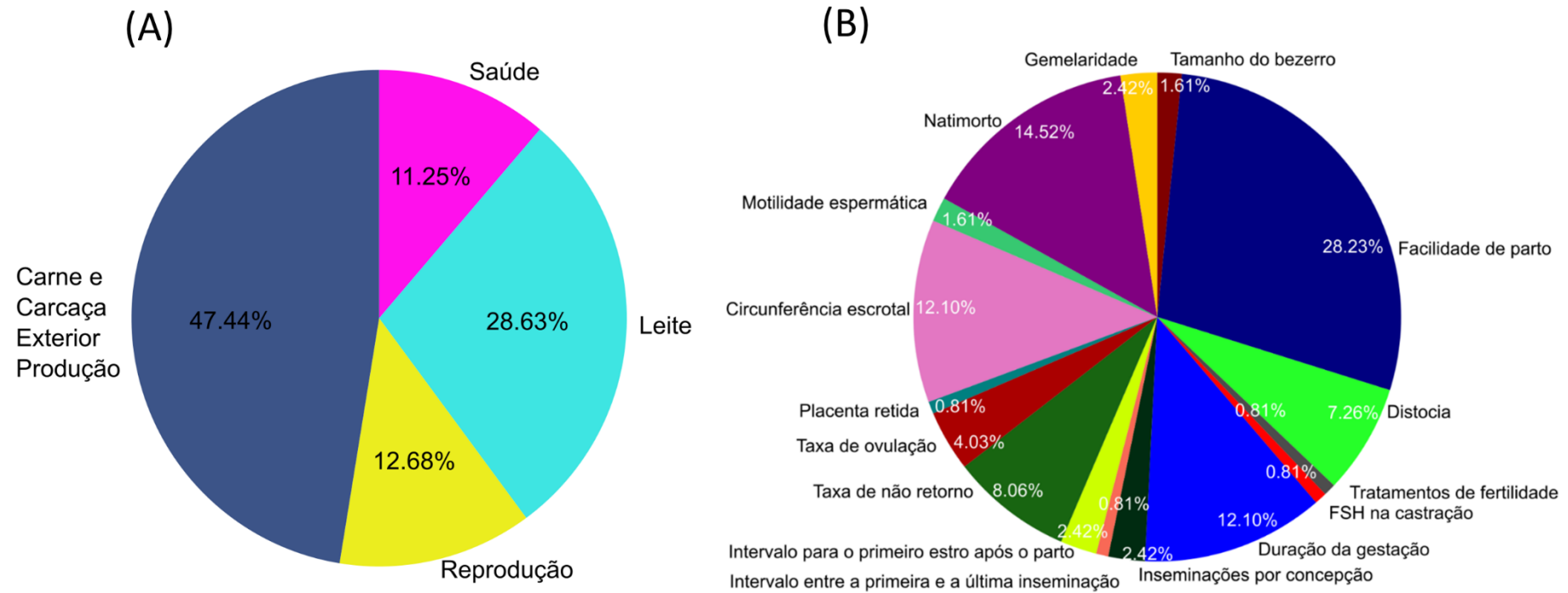
Figura 7 - Distribuição de novos miRNAs ocorrendo em regiões de QTL por tecido



Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico de barras exibindo a quantidade de novos miRNAs por tecido e por categoria de QTL

Figura 8 - Ocorrência de miRNAs em regiões de QTL por categoria



Fonte: Elaborado pelo autor

Porcentagem de ocorrência de miRNAs por categorias gerais (A) e categorias relacionadas a reprodução e fertilidade (B)

Tabela 4 - Ocorrência de novos miRNAs em regiões de QTL relacionadas à reprodução e fertilidade

(continua)

BTA	Id provisória	Tecido	QTL de fertilidade
1	1_138819324..138819399:+	<i>Caput, Cauda</i>	Intervalo para o primeiro estro após o parto
3	3_679	<i>Caput</i>	Facilidade de parto Taxa de não retorno
3	3_784	<i>Caput</i>	Distocia
3	3_841	<i>Cauda</i>	Taxa de não retorno
3	3_950	<i>Cauda</i>	Distocia Facilidade de parto
3	3_969	<i>Cauda</i>	Natimorto
3	3_971	<i>Cauda</i>	Natimorto
4	4_1168	<i>Caput</i>	Duração da gestação Facilidade de parto
4	4_1420	<i>Cauda</i>	Duração da gestação
4	4_1522	<i>Cauda</i>	Circunferência escrotal
5	5_1643	<i>Cauda</i>	FSH na castração
5	5_1992	<i>Cauda</i>	Facilidade de parto Taxa de ovulação
6	6_70996242..70996302:+	<i>Caput, Cauda, Parênquima testicular</i>	Duração da gestação
6	6_2271	<i>Cauda</i>	Circunferência escrotal Facilidade de parto Intervalo para o primeiro estro após o parto Placenta retida Tratamentos de fertilidade Taxa de não retorno
7	7_18947021..18947082:+	<i>Caput, Cauda</i>	Circunferência escrotal Duração da gestação Natimorto
7	7_2774	<i>Cauda</i>	Facilidade de parto Motilidade espermática
7	7_6019	Parênquima testicular	Motilidade espermática Taxa de não retorno
8	8_23350616..23350672:+	<i>Caput, Cauda</i>	Circunferência escrotal
8	8_3031	<i>Cauda</i>	Natimorto
8	8_3069	<i>Cauda</i>	Distocia Facilidade de parto Natimorto
8	8_6850	Parênquima testicular	Circunferência escrotal

(continuação)

BTA	Id provisória	Tecido	QTL de fertilidade
8	8_7305	Parênquima testicular	Distocia Facilidade de parto Natimorto
9	9_24479804..24479866:-	<i>Caput</i> , <i>Cauda</i>	Facilidade de parto
9	9_3582	<i>Cauda</i>	Facilidade de parto
11	11_4277	<i>Cauda</i>	Circunferência escrotal
11	11_4355	<i>Cauda</i>	Distocia
11	11_10650	Parênquima testicular	Intervalo para o primeiro estro após o parto
12	12_21090260..21090309:+	<i>Caput</i> , <i>Cauda</i>	Taxa de não retorno
12	12_4952	<i>Cauda</i>	Taxa de não retorno
12	12_5002	<i>Cauda</i>	Distocia
13	13_13432	Parênquima testicular	Natimorto
14	14_13966	Parênquima testicular	Duração da gestação Facilidade de parto
14	14_4742	<i>Caput</i>	Gemelidade Taxa de ovulação
14	14_5439	<i>Cauda</i>	Duração da gestação Facilidade de parto Inseminações por concepção
14	14_5481	<i>Cauda</i>	Duração da gestação Facilidade de parto
14	14_5624	<i>Cauda</i>	Gemelidade Taxa de ovulação
14	14_5626	<i>Cauda</i>	Gemelidade Taxa de ovulação
16	16_16073	Parênquima testicular	Natimorto
17	17_16492	Parênquima testicular	Facilidade de parto
17	17_6498	<i>Cauda</i>	Facilidade de parto
18	18_6137	<i>Caput</i>	Natimorto
18	18_6318	<i>Caput</i>	Circunferência escrotal Distocia Facilidade de parto Natimorto
18	18_7286	<i>Cauda</i>	Circunferência escrotal Distocia Facilidade de parto Natimorto
19	19_20108	Parênquima testicular	Tamanho do bezerro
19	19_7768	<i>Cauda</i>	Facilidade de parto Taxa de ovulação

(conclusão)			
BTA	Id provisória	Tecido	QTL de fertilidade
19	19_7870	<i>Cauda</i>	Circunferência escrotal Facilidade de parto
21	21_8331	<i>Cauda</i>	Facilidade de parto Natimorto
21	21_8598	<i>Cauda</i>	Circunferência escrotal Duração da gestação Natimorto
22	22_23568	Parênquima testicular	Tamanho do bezerro
26	26_8883	<i>Caput</i>	Duração da gestação Facilidade de parto Natimorto
26	26_8980	<i>Caput</i>	Facilidade de parto Intervalo para o primeiro estro após o parto Natimorto
26	26_10083	<i>Cauda</i>	Duração da gestação Facilidade de parto Natimorto
26	26_10146	<i>Cauda</i>	Facilidade de parto
26	26_10166	<i>Cauda</i>	Facilidade de parto
27	27_27890	Parênquima testicular	Circunferência escrotal Facilidade de parto
28	28_9211	<i>Caput</i>	Circunferência escrotal Facilidade de parto Natimorto
28	28_10463	<i>Cauda</i>	Circunferência escrotal Facilidade de parto Natimorto
29	29_10810	<i>Cauda</i>	Circunferência escrotal Duração da gestação Inseminações por concepção
29	29_12872752..12872814:+	<i>Caput</i> , Parênquima testicular	Circunferência escrotal Duração da gestação Inseminações por concepção
X	X_11104	<i>Cauda</i>	Distocia

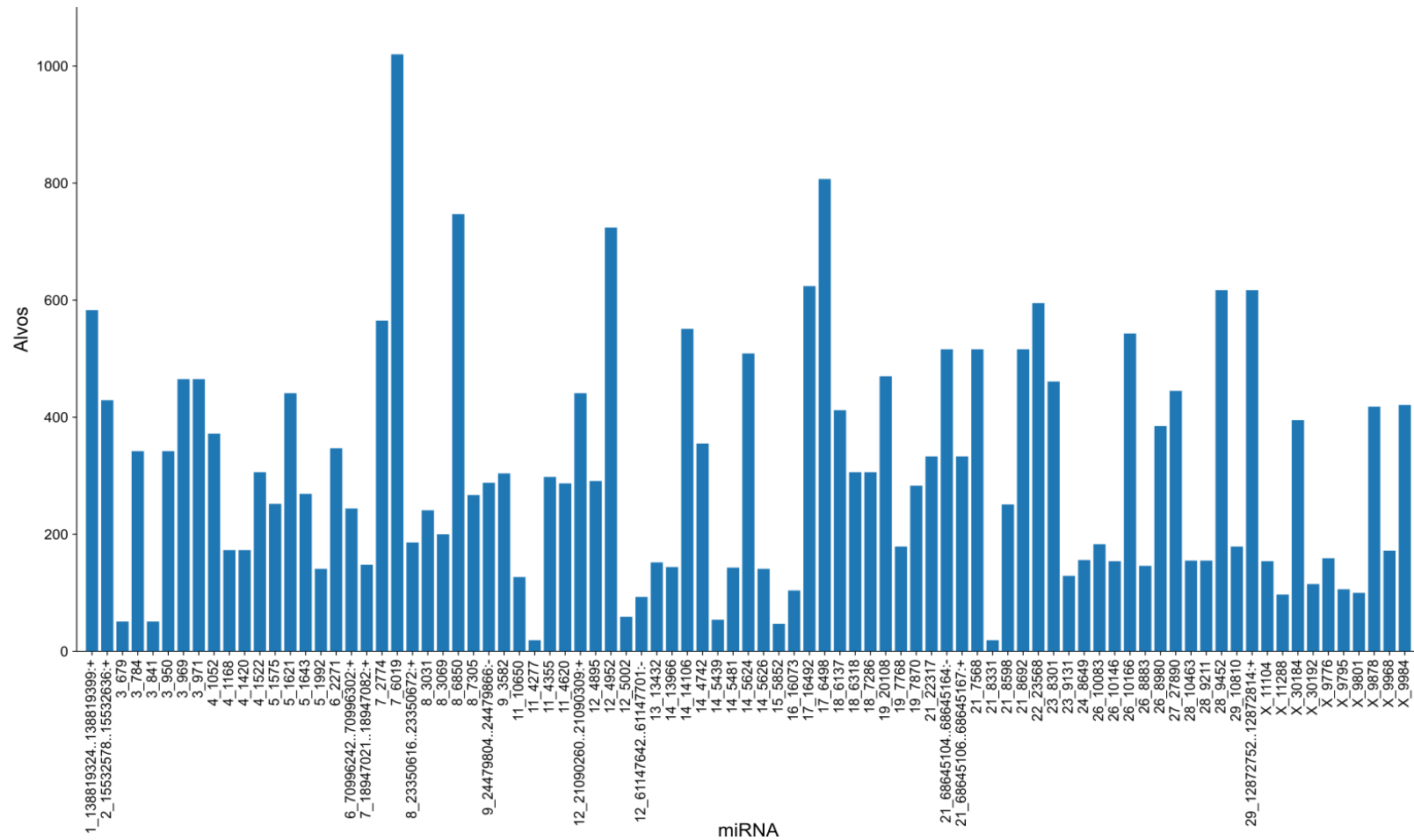
Fonte: Elaborado pelo autor

6.4 Predição de genes alvo

A predição de ligação dos novos miRNAs com os 3442 genes alvo diferencialmente expressos entre os três tecidos revelou que 2759 destes genes são alvos preditos para os 85 novos miRNAs sendo 11.089 ligações com 41 miRNAs em *cauda* do epidídimo, 5.823 ligações com 18 miRNAs em *caput* do epidídimo, 6.089

ligações com 15 miRNAs em parênquima testicular, 2.501 ligações com 8 miRNAs em *caput* e *cauda* do epidídimo, 1.133 ligações com 2 miRNAs em *caput* do epidídimo e parênquima testicular e 244 ligações com 1 miRNA em *cauda* e *caput* do epidídimo e parênquima testicular (Figura 9). Do total de 2759 genes alvo apenas 97 estão presentes em todos os tecidos (Figura 10).

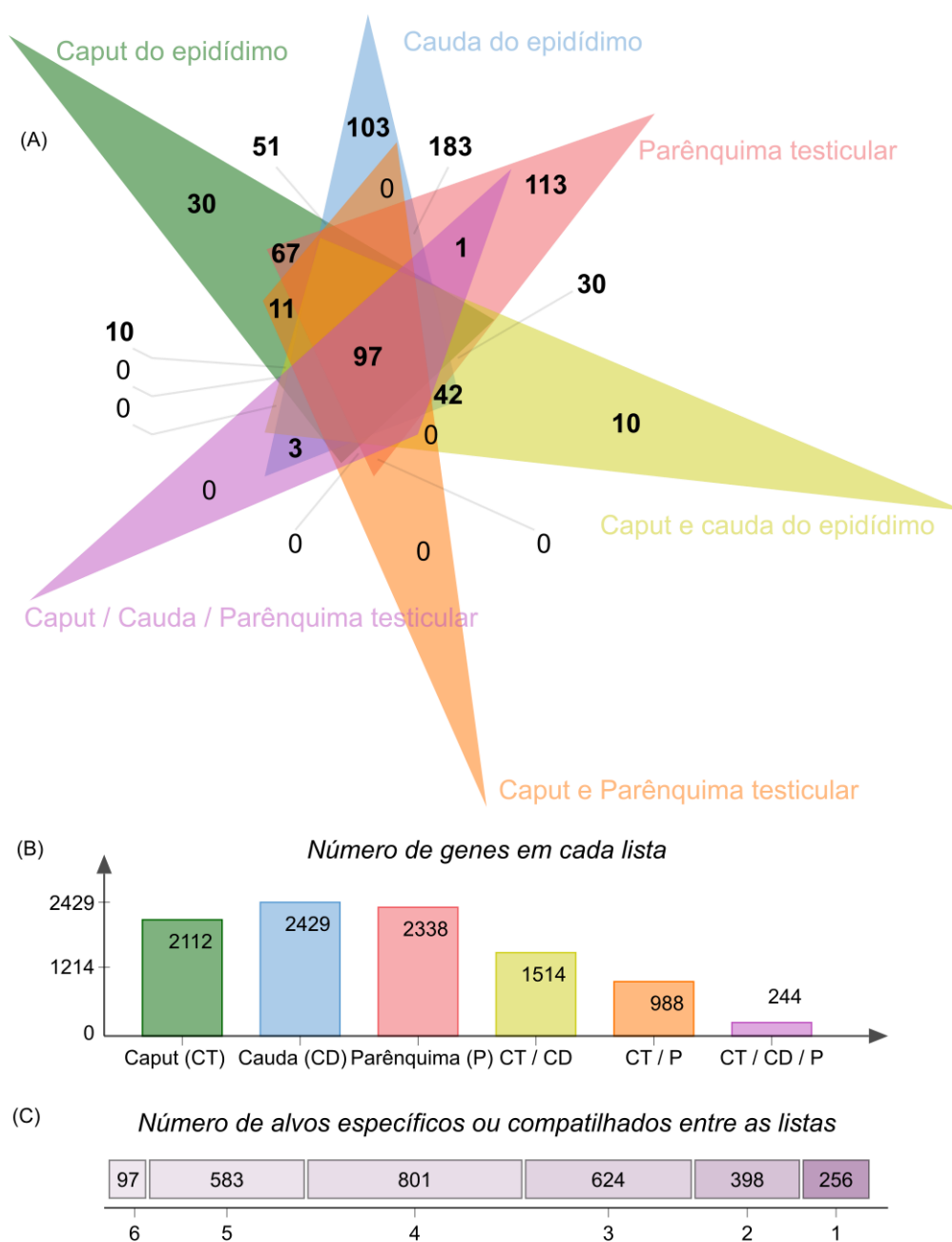
Figura 9 - Número de genes alvo por novo miRNA



Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico de barras com os 85 novos miRNAs e a quantidade de genes alvo preditos para cada miRNA

Figura 10 - Ocorrência de genes alvo comuns entre tecidos



Fonte: elaborado pelo autor

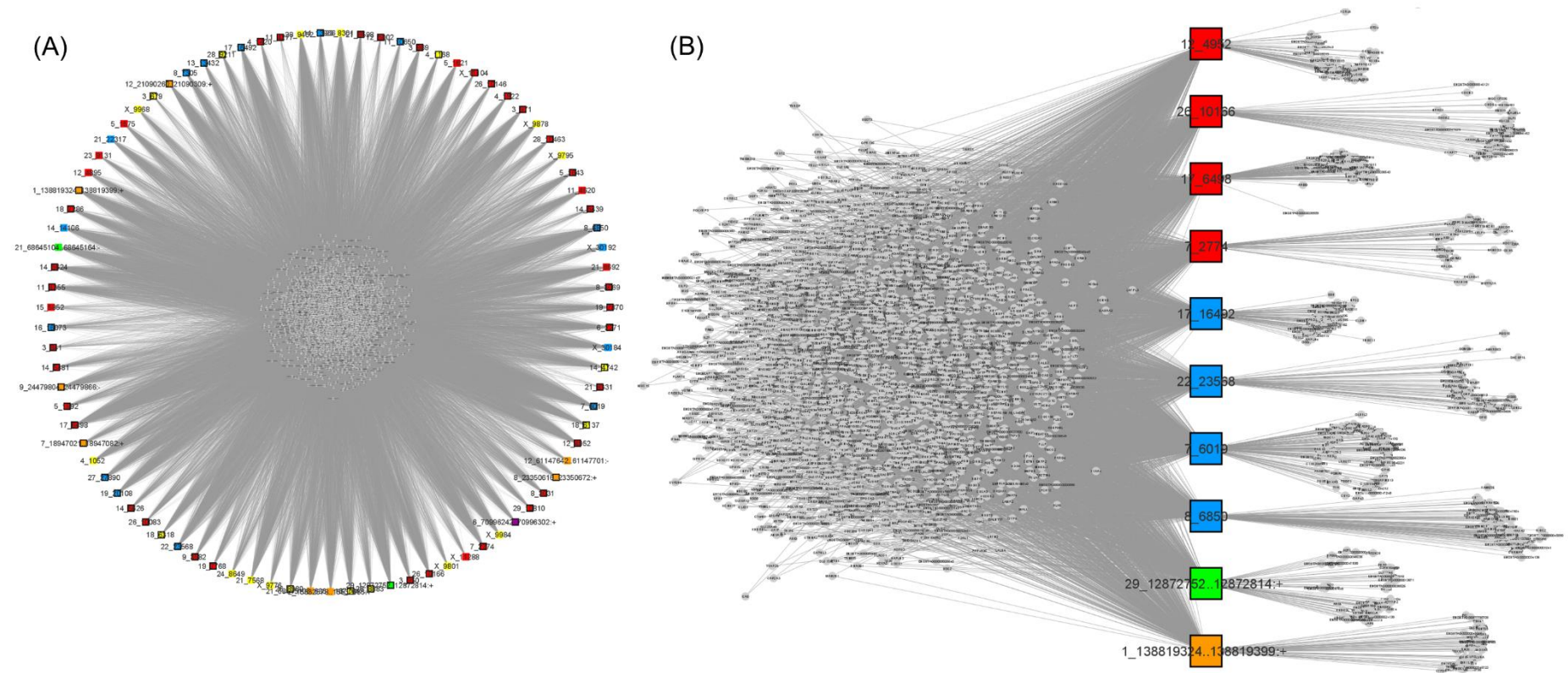
Diagrama de Venn (A) indicando os genes alvo compartilhados entre os diferentes grupos de tecidos. Gráfico de barras com o número de genes alvo para cada tecido (B). Caput do epidídimo = CT; Cauda do epidídimo = CD; Parênquima Testicular = P; Caput e Cauda do epidídimo = CT/CD; Caput do epidídimo e Parênquima testicular = CT / P; Caput e cauda do epidídimo e parênquima testicular = CT / CD / P. (C) Contagem do número de genes alvo exclusivos ou compartilhados em cada lista. O número abaixo do eixo x representa a quantidade de listas e o número dentro dos retângulos representa quantos genes alvo ocorrem apenas nestas listas.

6.5 Redes de interação entre os miRNAs e seus genes-alvo

Os *hub* miRNAs são miRNAs com mais genes alvo que a média mais 1x o desvio padrão do número de genes alvo. Identificamos 10 *hub* miRNAs que ocorrem em regiões de QTL relacionadas à fertilidade, sendo 4 no parênquima testicular (7_6019, 8_6850, 17_16492, 22_23568), 4 na *cauda* do epidídimo (17_6498, 12_4952, 7_2774, 26_10166) 1 ocorrendo no *caput* do epidídimo e no parênquima testicular (29_12872752..12872814:+) e 1 ocorrendo no *caput* e *cauda* do epidídimo (1_138819324..138819399:+).

O enriquecimento funcional para cada lista de *hub* miRNA identificou 14 vias para 8 dos 10 *hub* miRNAs, relacionadas ao sistema digestório (absorção mineral, secreção pancreática, secreção salivar e digestão e absorção de proteínas); sistema nervoso (sinapse glutamatérgica e sinapse serotoninérgica); transdução de sinal (via de sinalização cAMP e via de sinalização cGMP-PKG); sistema excretor (reabsorção de cálcio endócrino e regulada por outros fatores) moléculas sinalizadoras e interação (interação ligante-receptor neuro ativo) metabolismo (vias metabólicas); dependência de substâncias (vício em nicotina); metabolismo de outros aminoácidos (metabolismo da beta-alanina) e sistema endócrino (esteroidogênese ovariana) (KANEHISA *et al.*, 2021) (Figura 11) e 6 termos de ontologia (Tabela suplementar 2).

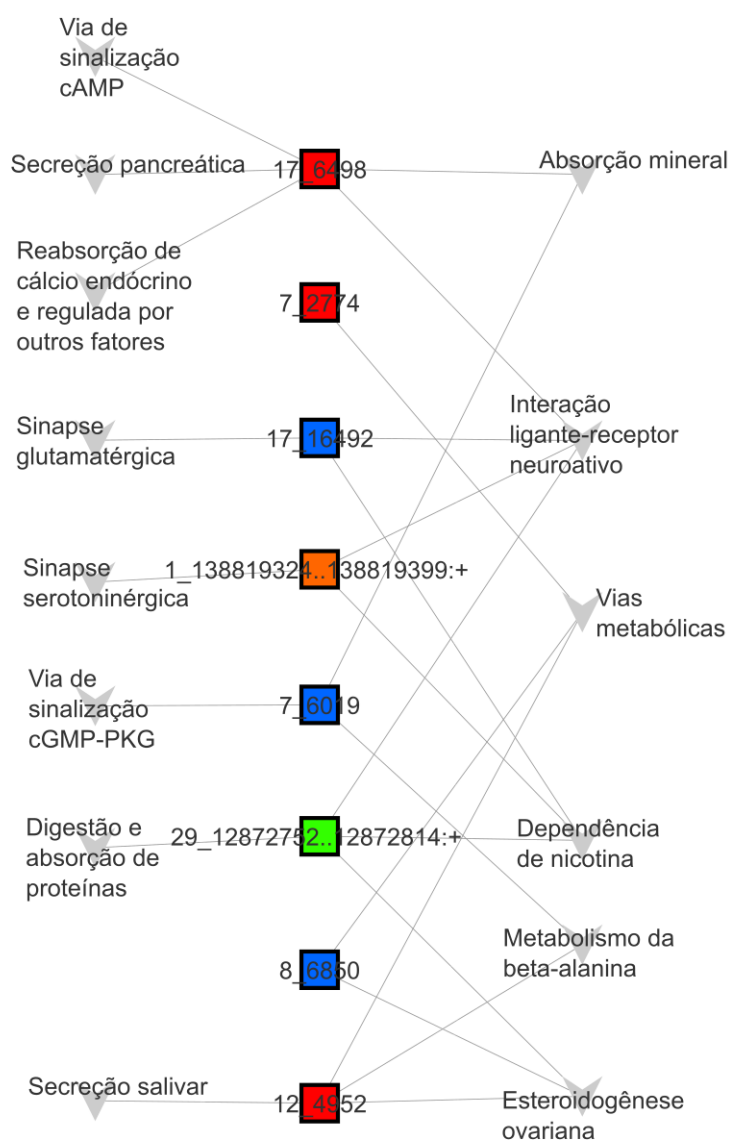
Figura 11 - Rede de interação entre os novos miRNAs identificados e seus alvos preditos



Fonte: Elaborado pelo autor

Representação dos 85 novos miRNAs identificados em tecido testicular de *Bos indicus* e seus genes alvos preditos (A). Representação dos 10 *hub* miRNAs exibindo seus genes alvos compartilhados (à esquerda) e os genes alvos únicos (à direita) (B). Formato: miRNAs e *hub* miRNAs = retângulos, alvos preditos = círculos. Contorno: miRNAs em regiões de QTLs de reprodução = preto. Cores: miRNAs identificados somente em *caput* do epidídimo = amarelo, miRNAs identificados somente em *cauda* do epidídimo = vermelho, miRNAs identificados somente em parênquima testicular = azul, miRNAs identificados em *caput* e em *cauda* do epidídimo = laranja, miRNAs identificados em *caput* do epidídimo e em parênquima testicular = verde e miRNAs identificados em *caput*, *cauda* do epidídimo e parênquima testicular = roxo.

Figura 12 - Vias enriquecidas dos genes alvo dos *hub* miRNAs



Fonte: Elaborado pelo autor

Representação das vias enriquecidas compartilhadas entre 8 dos 10 *hub* miRNAs. Formato: *hub* miRNAs = retângulos e vias enriquecidas = formato em "V". Cores: miRNAs identificados somente em *cauda* do epidídimo = vermelho, miRNAs identificados somente em parênquima testicular = azul, miRNAs identificados em *caput* e em *cauda* do epidídimo = laranja, miRNAs identificados em *caput* do epidídimo e em parênquima testicular = verde.

7 DISCUSSÃO

7.1 Animais, descrição geral e caracterização dos novos miRNAs

Os animais utilizados neste trabalho foram abatidos para fins comerciais e a coleta de amostras ocorreu de forma oportuna. Não há registros se estes animais foram expostos a fêmeas durante a vida ou coleta de ejaculado dos mesmos para fins de comparação de detecção de miRNAs entre o tecido e o ejaculado.

Por se tratar da identificação de novos miRNAs não foi possível quantificar a sua expressão, inviabilizando a análise de componentes principais (PCA).

O uso dos diferentes tecidos neste estudo (*caput* e *cauda* do epidídimo e parênquima testicular) permite associar a expressão dos novos miRNAs a diferentes etapas da espermatogênese, especialmente no que diz respeito às proteínas associadas ao DNA (FORTES *et al.*, 2014). No *caput* e na *cauda*, o DNA espermático está mais ligado a protaminas do que histonas, já no parênquima testicular seria ao contrário (FORTES *et al.*, 2014).

O presente trabalho identificou 415 novos miRNAs e, após a aplicação de filtros para aumentar a confiabilidade da predição, este número foi reduzido para 85.

A versão 22.1 do miRBase utilizada neste trabalho conta com 1.030 sequências de miRNAs maduros anotados de bovinos *Bos taurus*, desta forma, a presente descoberta pode contribuir com um aumento de 8,25% na anotação de miRNAs na espécie bovina, melhorando a compreensão acerca da biologia da espermatogênese e o entendimento de dados gerados a partir de estudos de associação genômica ampla (*Genome-wide association study* - GWAS) que investigam a reprodução e fertilidade.

Não foram identificados novos miRNAs nos cromossomos BTA10, BTA20, BTA25 e BTAY. O cromossomo com a maior quantidade de novos miRNAs foi o BTAX com 10 novos miRNAs. Polimorfismos identificados no cromossomo X de bovinos Brahman foram associados a características ligadas a morfologia do esperma, circunferência escrotal, fragmentação do DNA espermático e deficiência de protaminas sugerindo especialização do cromossomo X para características relacionadas a fertilidade de machos (FORTES *et al.*, 2020).

A média de comprimento dos precursores de miRNAs foi 59 nucleotídeos, sendo o maior precursor o miRNA 14_14106 no parênquima testicular com 95 nucleotídeos e os menores precursores os miRNAs X_9795 e X_9984 ambos no *caput* do epidídimo com 47 nucleotídeos.

A média de comprimento dos miRNAs maduros foi 21 nucleotídeos sendo os maiores maduros os miRNAs 16_16073 e 22_23568 ambos no parênquima testicular com 25 nucleotídeos e os menores maduros os miRNAs 5_1621, 26_10146 e X_11104 (*cauda* do epidídimo) e os miRNAs X_9795 e X_9948 (*caput* do epidídimo) com 17 nucleotídeos.

Dentre os 85 novos miRNAs, 24 miRNAs que ocorreram em diferentes tecidos apresentaram alta similaridade em suas coordenadas genômicas, tendo apenas alguns nucleotídeos *upstream* ou *downstream* nas regiões de *start* e/ou *end*. Esse fato pode indicar a identificação de novos miRNAs e suas potenciais isoformas ou a presença de parálogos nas sequências dos miRNAs. Apesar da alta similaridade, a presença de variantes nessas sequências pode indicar funções biológicas distintas, considerando o estudo *in silico* anterior do mesmo grupo que evidenciou que SNPs que ocorrem em sequências de miRNA podem alterar a predição da ligação de miRNA com seus genes alvo e alterar a energia livre necessária para a estabilidade da forma secundária de miRNAs (SOUSA *et al.*, 2021). Devido a esses fatos, para fins de melhor compreensão funcional desses miRNAs, os miRNAs não idênticos foram identificados com Id provisórios distintos.

Foram identificados 11 miRNAs expressos com sequências e coordenadas genômicas idênticas em mais de um tecido que receberam Ids provisórias contendo sua coordenada genômica. Destes 11, 7 novos miRNAs ocorrem em regiões de QTL relacionadas à fertilidade sendo os miRNAs 7_18947021..18947082:+ e 8_23350616..23350672:+ que ocorrem em *caput* e *cauda* simultaneamente e o miRNA 29_12872752..12872814:+ que ocorre simultaneamente em *caput* e parênquima testicular ocorrem em regiões de QTL relacionadas a circunferência escrotal (Tabela 4). O fato destes 11 miRNAs terem sido identificados em diferentes tecidos aumenta a confiabilidade na predição da descoberta destes miRNAs.

A determinação dos loci dos novos miRNAs (Tabela suplementar 1) indicou 8 dos novos miRNAs (9.41%) ocorreram em regiões codificadoras (exon). Destes, 7 ocorrem em regiões de precursores de miRNAs anotados sendo 5 em fita inversa, 2

na mesma fita e 1 ocorrendo na mesma fita da região do gene HSPA1A. Dos novos miRNAs que ocorrem em regiões intrônicas, os miRNAs X_9968 e X_11288 tem, entre seus genes alvo preditos, o próprio gene do qual se originam, o gene ENSBTAG00000008248. Uma revisão de Olena e Patton (2010) descreve que os miRNAs que ocorrem em regiões de exon e miRNAs que tem efeito regulatório em seus genes hospedeiros são extremamente raros corroborando com os achados do presente estudo.

No presente estudo observamos maior quantidade de novos de miRNAs na *cauda* do epidídimo (49,4%). A quantidade de *reads* sequenciadas em cada tecido indicou que o parênquima testicular teve a maior contagem (quase 1 milhão de *reads* a mais que *cauda*) e apenas 18,07% das ocorrências dos miRNAs, sugerindo que este conjunto de novos miRNAs atuam promovendo uma maior regulação na fase final da espermatogênese, quando a quantidade de protaminas na *cauda* do epidídimo é maior que no *caput* do epidídimo e parênquima testicular (FORTES *et al.*, 2014). A suposição de maior regulação na *cauda* é suportada pela maior quantidade de genes alvo neste tecido (Figura 10), maior número de ocorrências em regiões de QTL (Figura 7) e atuando em na maior quantidade de vias enriquecidas (8).

7.2 Similaridade com miRNAs anotados em outras espécies

Os miRNAs são conservados entre espécies, incluindo humanos (KABEKKODU *et al.*, 2018). Devido a esse fato, o presente estudo verificou a similaridade dos novos miRNAs com miRNAs anotados em outras espécies.

Entre as espécies investigadas *Bos taurus* e *Homo sapiens* foram as espécies com maior ocorrência, corroborando com estudos anteriores que mostram maior similaridade entre o genoma bovino e humano apesar da proximidade evolutiva entre humanos e camundongos (BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM *et al.*, 2009) indicando que os miRNAs descobertos no presente estudo podem colaborar com estudos que investigam a funcionalidade do genoma de humanos.

Os miRNAs são considerados da mesma família se apresentarem a mesma *seed* (OLENA; PATTON, 2010). Os miRNAs anotados em outras espécies pertencem a 3 famílias de miRNA sendo 3 da família 122, 3 da família 145 e 3 da família 203.

Dos 14 novos miRNAs com similaridade com outras espécies 5 foram identificados em mais de um tecido. Os miRNAs 12_21090260..21090309:+ (caput e cauda) e 21_68645106..68645167:+ (caput e cauda) similaridade com todas as espécies comparadas, com exceção de *Bos taurus*, indicando que estes miRNAs tem grande chance de serem verdadeiros, dada a conservação evolutiva com as famílias de miRNA 145 e 203 respectivamente.

A família do miRNA 145 conta com 26 registros incluindo a espécie bovina (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019). O miR-145 é altamente relacionado com câncer sendo considerado um supressor de tumor, uma vez que sua expressão é baixa em diversos tecidos tumorais (YE; SHEN; ZHOU, 2019), no entanto, um ensaio com células de Ishikawa detectou o gene PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio 1, também conhecido como SERPINE1) como alvo deste miRNA. A expressão de PAI-1 é regulada negativamente nas células do endométrio de mulheres com falhas de implantação de embrião repetidas, sugerindo que o miR-145 tem papel importante na implantação do embrião em fertilização in vitro (LIU *et al.*, 2020). Em camundongos o miR-145 regula a iniciação do crescimento, desenvolvimento e manutenção dos folículos primordiais e sua perda superativa estes folículos e desregula a zona pelúcida além de atenuar a proliferação de células granulosas (REZA *et al.*, 2019) sugerindo papel regulatório em processos reprodutivos do miRNA 12_21090260..21090309:+ considerando que este miRNA ocorre em região de QTL relacionadas a reprodução de fêmea (taxa de não retorno).

O miRNA 145b é um parálogo do miRNA 145 identificado no tecido cardíaco de *Mus musculus* (HUMPHREYS *et al.*, 2012) ocorrendo exclusivamente nesta espécie. O miRNA 5_1621 (cauda do epidídimo) do presente estudo revelou similaridade com este parálogo e com outros membros da família de miR-145 em *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* podendo ser uma nova variante deste miRNA e atuar de forma semelhante ao encontrado em humanos e camundongos data a conservação evolutiva.

A família de miRNA 203 conta com 32 registros em diversas espécies com exceção da espécie bovina. Em camundongos o miR-203 tem papel de manutenção das espermatogônias e diferenciação meiótica através da regulação da proteína Rbm44 (REZA *et al.*, 2019), no entanto o miRNA 21_68645106..68645167:+ não foi identificado em regiões de QTL relacionadas a fertilidade no presente estudo.

Há 281 miRNAs primários bovinos da família 2285 anotados na plataforma miRBase (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019), no entanto, há miRNAs que apresentaram similaridade com os novos miRNAs do presente estudo que ainda não foram depositados nesta plataforma (2285BS, 2285CM, 2285N-7 e 22854F), portanto é possível que o programa miRDeep2 tenha considerado estas sequências como novas por não estarem disponíveis na versão utilizada neste estudo. Os novos miRNAs que apresentaram similaridade com miRNAs das famílias 2284 e 2285 de *Bos taurus* não apresentaram similaridade com miRNAs anotados em outras espécies (Tabela 2 e Tabela 3) sugerindo possíveis novas variantes para estas famílias.

O MIR2285BE foi identificado em gordura do leite, soro e células das glândulas mamárias de vacas Holandesa Canadense e apresentou similaridade com o miRNA 14_4742 (*caput* do epidídimo) que ocorre em região de QTL relacionada a produção de leite.

O miRNA MIR2285Y foi identificado em músculo semitendíneo e masseter de bovinos pretos japoneses (MUROYA *et al.*, 2013) e apresentou similaridade com os miRNAs 4_1522 (*cauda*), 2_15532578..15532636:+ (*cauda* e *caput* do epidídimo) e 18_6318 (*caput*). O miRNA 18_6318 ocorre em regiões de QTL relacionadas a fertilidade que incluem circunferência escrotal, distocia, facilidade de parto e natimorto. A similaridade entre o miRNA anotado e os 3 novos miRNAs pode reforçar a confiança na proposição de serem novos miRNAs bovinos verdadeiros.

Os miRNA MIR2285BS e MIR2285CM foram identificados em glândulas mamárias de vacas Holandesa Canadense submetidas à variação de dieta que gerou alteração na gordura do leite (LI *et al.*, 2015) e apresentaram similaridade com o miRNA 18_6318 (*caput*) do presente estudo que ocorre em regiões de QTL relacionadas com reprodução tanto de características do macho (circunferência escrotal) como características da fêmea (distocia, facilidade de parto, natimorto) além de QTLs relacionadas à produção de leite (porcentagem de proteína e gordura do leite).

O miRNA MIR2285N-7 foi identificado no testículo e ovário de bovinos da raça Holandesa (HUANG *et al.*, 2011) e apresentou similaridade com o miRNA 3_784 (*caput* do epidídimo) que ocorre em região de QTL de reprodução relacionada a fêmea (distocia).

O miRNA MIR2285AA foi identificado no tecido mamário bovino infectado por *Streptococcus uberis* e parece desempenhar papel no sistema imune inato (LAWLESS *et al.*, 2013). O miRNA 6_70996242..70996302:+ (*caput*, *cauda* e *parênquima testicular*) apresentou similaridade com este miRNA e ocorre em uma região de QTL também relacionada às características da fêmea (*duração da gestação*).

O miRNA MIR2284F foi identificado em células de rim bovino após infecção por herpesvírus bovino (GLAZOV *et al.*, 2009) e apresentou similaridade com o miRNA 7_18947021..1847082:+ (*caput* e *cauda* do epidídimo) que ocorre em regiões de QTL relacionadas a *circunferência escrotal*, *duração da gestação* e *natimorto* e regiões de importância imunológica como *nível de imunoglobulina G* e *proliferação celular induzida por concavalinaA*.

O novo miRNA 24_8649 (*caput* do epidídimo) apresentou similaridade com os miRNAs da família 122 de *Bos taurus*, *Homo sapiens* e *Mus musculus*. Um estudo *in vitro* identificou o miR-122 como regulador da proteína de ligação de mRNA de LRH (LRBP) que regula os níveis de expressão da proteína receptora do hormônio luteinizante (LHR) no ovário de roedores e humanos evitando a hiper estimulação ovariana, uma complicação comum da reprodução assistida (MENON; MENON; GULAPPA, 2018). O miR-122 regula negativamente a proteína de transição TNP2 que substitui a protamina participando da compactação do material genético durante a espermiogênese, atua como regulador via de indução de apoptose das células germinativas (REZA *et al.*, 2019), contudo, este miRNA não foi identificado em região de QTL relacionada a reprodução.

Os novos miRNAs identificados com similaridade com miRNAs com função regulatória de processo reprodutivos conhecidos ou descobertos em tecidos não relacionados com fertilidade; podem servir como subsídio para pesquisadores que investigam outros aspectos de interesses dos criadores, porém, necessitam de validação para poder fornecer informações que elucidam processos biológicos.

7.3 Ocorrência dos novos miRNAs em regiões de QTL

A base de dados utilizada neste estudo (Animal QTLdb) disponibiliza dados de QTLs identificadas desde 1994. Nosso estudo encontrou 72 novos miRNAs ocorrendo

em 978 regiões de QTLs que correspondem a 103 artigos publicados entre 1998 e 2020. Em 2009 foi desenvolvida e implementada a tecnologia de genotipagem por chip de SNP em bovinos (MATUKUMALLI *et al.*, 2009). O uso de SNP chips aumentou a precisão na detecção de regiões responsáveis por fenótipos e seus possíveis genes candidatos. Assim, apenas trabalhos publicados após 2009 seriam de maior interesse para anotação de QTLs relacionadas aos miRNAs descobertos. Apenas 1 artigo publicado utilizou a tecnologia de SNPchip para descobrir regiões de QTLs nas quais os novos miRNAs ocorreram. Os demais QTLs que corresponderam aos novos miRNAs foram localizados por tecnologias que caíram em desuso (como os microssatélites) e são muito grandes, de forma que não é possível associar o papel dos novos miRNAs baseando-se apenas em sua ocorrência nestas regiões.

As regiões de QTL relacionadas a reprodução foram um total de 12,68%, sendo a maior ocorrência em *cauda* do epidídimo, seguido de *caput* do epidídimo e parênquima testicular. Nossos resultados indicaram maior ocorrência de QTLs relacionadas ao grupo “produção, exterior e carne e carcaça” (47,44%). Estes achados podem estar relacionados com o interesse dos pesquisadores evidenciado nas nuvens de palavras disponíveis na plataforma nas quais os traços fenotípicos com maior frequência de publicação (leite e peso) e submetidos à plataforma, por ano, aparecem em tamanho maior (Figura 13). Desta forma, a quantidade reduzida de resultados para fenótipos de reprodução pode ser resultado um viés da base de dados.

Aproximadamente 71% dos novos miRNAs ocorreram em regiões de QTL relacionadas com reprodução possivelmente relacionado ao fato de que foram utilizados tecidos do sistema reprodutivo de touros nesse estudo.

Novos miRNAs foram identificados em regiões associadas com características relacionadas com a fertilidade de fêmeas, mesmo adotando touros nesse estudo. O uso do material genético de touros principalmente visando aumentar o mérito genético de fêmeas é uma prática adotada em melhoramento animal.

O presente estudo detectou 15 novos miRNAs ocorrendo em regiões relacionadas à circunferência escrotal e 2 miRNAs ocorrendo em regiões relacionadas à motilidade espermática (Tabela 4). Em sua revisão, Butler destaca que a seleção para aumentar o tamanho da circunferência escrotal afeta características da fêmea como a diminuição do intervalo entre partos e melhora das taxas de prenhez e, apesar

de resultados conflitantes na literatura sobre o efeito da circunferência escrotal influenciando a fertilidade de fêmeas, esta característica é a única coletada e utilizada para avaliação genética (BUTLER *et al.*, 2020).

Figura 13 - Nuvem de palavras da plataforma *Animal QTLdb* por ano



Fonte: Adaptado de Hu; Park; Reecy, 2022

Nuvem de palavras geradas de acordo com a quantidade de publicações submetidas à plataforma Animal QTLdb. Os anos destacados são correspondentes às 103 publicações que demonstraram correspondência entre as QTLs e os novos miRNAs. O tamanho das palavras representa a quantidade de publicações relacionadas a determinada característica.

7.4 Alvos, redes e enriquecimento funcional

A predição de ligação de miRNAs com seus genes alvo revelou que todos os miRNAs descobertos no presente estudo tem potencial para regular genes diferencialmente expressos entre os 3 tecidos, identificados em um estudo anterior pelo mesmo grupo com os mesmos animais (DE LIMA *et al.*, 2021).

O miRNA com a maior quantidade de alvos foi o miRNA 7_6019 identificado no parênquima testicular com predição de ligação a 1.020 genes alvo e ocorrendo em uma região de QTL relacionada com motilidade espermática.

Os miRNAs 11_4277 e 21_8331 ambos identificados na *cauda* do epidídimo tiveram a menor quantidade de predição de ligação com genes alvo sendo apenas 19 e ocorrem em regiões de QTL relacionadas a circunferência escrotal (11_4277), facilidade de parto e natimorto (21_8331).

Apesar de apresentar um grupo maior de genes alvos preditos para os miRNAs identificados na *cauda* do epidídimo (2.429), não houve diferença significativa para o grupo de genes alvo preditos para os miRNAs identificados no parênquima testicular (2.338) e *caput* do epidídimo (2.112) indicando sobreposição da função regulatória dos novos miRNAs identificados (Figura 11).

Dentre todos os genes alvo, apenas 256 genes estavam em uma única lista de genes alvo por tecido e 97 genes alvo preditos estava presentes em todos os tecidos (Figura 10 C).

O enriquecimento funcional destes genes (Tabela suplementar 2) indicou relação destes genes com atividade motora relacionada ao movimento de flagelo, proteínas relacionadas a atividade motora e moléculas de aderência entre a membrana celular e o citoesqueleto, fundamentais para a motilidade espermática. A rede de interação (Figura 11 A) indicou alta interação entre os genes diferencialmente expressos entre os tecidos e os novos miRNAs sugerindo intensa regulação.

Dentre os 10 *hub* miRNAs identificados na nossa rede de interação foi observada sobreposição da predição de genes alvo (Figura 11 B) evidenciando diferença notável entre os genes alvos únicos preditos para cada *hub* miRNA (à direita) e os genes alvo compartilhados (à esquerda).

O enriquecimento funcional realizado separadamente para os genes alvo de cada *hub* miRNA identificou 14 *vias* relacionadas ao sistema digestório (absorção

mineral, secreção pancreática, secreção salivar e digestão e absorção de proteínas); sistema nervoso (sinapse glutamatérgica e sinapse serotoninérgica); transdução de sinal (via de sinalização cAMP e via de sinalização cGMP-PKG); sistema excretor (reabsorção de cálcio endócrina e regulada por outros fatores) moléculas sinalizadoras e interação (interação ligante-receptor neuro ativo) metabolismo (vias metabólicas); dependência de substâncias (vício em nicotina); metabolismo de outros aminoácidos (metabolismo da beta-alanina) e sistema endócrino (esteroidogênese ovariana).

Dentre estas 14 vias, destacam-se a via de absorção mineral, via de sinalização cAMP, e via do metabolismo da beta-alanina e a via da esteroidogênese ovariana.

A relação entre absorção mineral e a qualidade do esperma é amplamente conhecida. Revisões de Salas-Huetos et al. (2018) e Buhling et al. (2019) descrevem o aumento na concentração total e contagem de espermatozoides por suplementação com selênio e zinco e aumento da taxa de motilidade espermática e morfologia aprimorada devido a suplementação com selênio em humanos. Em sua revisão Jansen e Deguchi (1996) descrevem a atuação do selênio na cápsula da mitocôndria dos espermatozoides e sua ausência pode gerar problemas de infertilidade em bovinos e outras espécies incluindo humanos. A suplementação por selênio na espécie bovina também tem efeitos na fertilidade de fêmeas atuando na redução da incidência de metrite e cistos ovarianos e redução da morte embrionária, conforme revisado por Mehdi e Dufrasne (2016). Os genes alvo dos *hub* miRNAs 17_6498 (*cauda* do epidídimo) e 7_6019 (parênquima testicular) indicaram participar da via de absorção mineral. O miRNA 7_6019 também ocorre em regiões de QTL relacionadas com motilidade espermática e taxa de não retorno, sugerindo que sua regulação de genes alvo envolvidos nas via de absorção mineral pode desempenhar papel importante tanto na reprodução de machos quanto de fêmeas.

A Adenosina cíclica 3',5'-monofosfato (cAMP) é uma molécula intracelular, ubíqua e essencial (ASLAM; LADILOV, 2022). A enzima AC10 atua na membrana celular, mitocôndrias, núcleo, centríolos, fusos mitóticos e corpos intermediários e gera cAMP a partir de ATP. A cAMP desempenha funções celulares associadas a capacitação e fertilidade espermática (ZACCOLO; ZERIO; LOBO, 2021). Os genes alvo do *hub* miRNA 17_6498 (*cauda* do epidídimo) indicaram participar da via de

sinalização cAMP. Este miRNA foi identificado na *cauda* do epidídimo sugerindo regulação dos genes responsáveis pela fase final da espermatogênese.

A beta-alanina é um neurotransmissor e possui 5 sítios receptores, entre eles receptor GABA-A; receptor GABA-C; e bloqueio da captação glial de GABA mediada pela proteína GAT (TIEDJE *et al.*, 2010). O GABA é um neurotransmissor e estimula a reação acrossômica de bovinos (PUENTE; TARTAGLIONE; RITTA, 2011). A via da beta-alanina foi identificada como diferencialmente expressa em um estudo que investigou o perfil metabólico de espermatozoides de touros Holstein comparando grupos de alta e baixa fertilidade (MENEZES *et al.*, 2019). Os genes alvos dos *hub* miRNAs 7_6019 (parênquima testicular) e 12_4952 (*cauda* do epidídimo) sugerem regulação desta via. O miRNA 7_6019 ocorre em região de QTL relacionada à motilidade espermática podendo desempenhar papel na qualidade do sêmen.

Os esteroides ovarianos são críticos para a função uterina normal, estabelecimento e manutenção da gravidez e desenvolvimento da glândula mamária (MILLER; AUCHUS, 2011). Nossos resultados indicaram miRNAs ocorrendo em regiões de QTL relacionadas com a fertilidade de fêmeas que somam mais de 60% das ocorrências como facilidade de parto 28,23%, natimorto 14,52%, duração da gestação 12,10% e distocia 7,26%. Sabendo que tais características podem ser afetadas pelos esteroides ovarianos e que características do macho são herdáveis e podem ter efeito na prole, 3 dos *hub* miRNAs identificados neste estudo miRNA 29_12872752..12872814:+ (*caput* do epidídimo, parênquima testicular, miRNA 8_6850 (parênquima testicular) e 12_4952 (*cauda* do epidídimo) compartilham genes alvo preditos que participam da esteroidogênese ovariana e tem potencial podem exercer um papel importante para características de fertilidade.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo descreveu novos miRNAs em tecido testicular e acrescenta informações para o genoma de *Bos indicus* fornecendo caminhos para formulação de novas hipóteses e elucidação de processos biológicos relacionados com a fertilidade e reprodução.

REFERÊNCIAS

- ABASCAL, F.; ACOSTA, R.; ADDLEMAN, N. J.; ADRIAN, J.; AFZAL, V.; AKEN, B.; AKIYAMA, J. A.; JAMMAL, O. Al; AMRHEIN, H.; ANDERSON, S. M.; ANDREWS, G. R.; ANTOSHECHKIN, I.; ARDLIE, K. G.; ARMSTRONG, J.; ASTLEY, M.; BANERJEE, B.; BARKAL, A. A.; BARNES, I. H. A.; BAROZZI, I.; BARRELL, D.; BARSON, G.; BATES, D.; BAYMURADOV, U. K.; BAZILE, C.; BEER, M. A.; BEIK, S.; BENDER, M. A.; BENNETT, R.; BOUVRETTE, L. P. B.; BERNSTEIN, B. E.; BERRY, A.; BHASKAR, A.; BIGNELL, A.; BLUE, S. M.; BODINE, D. M.; BOIX, C.; BOLEY, N.; BORRMAN, T.; BORSARI, B.; BOYLE, A. P.; BRANDSMEIER, L. A.; BRESCHI, A.; BRESNICK, E. H.; BROOKS, J. A.; BUCKLEY, M.; BURGE, C. B.; BYRON, R.; CAHILL, E.; CAI, L.; CAO, L.; CARTY, M.; CASTANON, R. G.; CASTILLO, A.; CHAIB, H.; CHAN, E. T.; CHEE, D. R.; CHEE, S.; CHEN, H.; CHEN, H.; CHEN, J. Y.; CHEN, S.; CHERRY, J. M.; CHHETRI, S. B.; CHOUDHARY, J. S.; CHRAST, J.; CHUNG, D.; CLARKE, D.; CODY, N. A. L.; COPPOLA, C. J.; COURSEN, J.; D'IPPOLITO, A. M.; DALTON, S.; DANYKO, C.; DAVIDSON, C.; DAVILA-VELDERRAIN, J.; DAVIS, C. A.; DEKKER, J.; DERAN, A.; DESALVO, G.; DESPACIO-REYES, G.; DEWEY, C. N.; DICKEL, D. E.; DIEGEL, M.; DIEKHANS, M.; DILEEP, V.; DING, B.; DJEBALI, S.; DOBIN, A.; DOMINGUEZ, D.; DONALDSON, S.; DRENKOW, J.; DRESZER, T. R.; DRIER, Y.; DUFF, M. O.; DUNN, D.; EASTMAN, C.; ECKER, J. R.; EDWARDS, M. D.; EL-ALI, N.; ELHAJJAJY, S. I.; ELKINS, K.; EMILI, A.; EPSTEIN, C. B.; EVANS, R. C.; EZKURDIA, I.; FAN, K.; FARNHAM, P. J.; FARRELL, N.; FEINGOLD, E. A.; FERREIRA, A. M.; FISHER-AYLOR, K.; FITZGERALD, S.; FLICEK, P.; FOO, C. S.; FORTIER, K.; FRANKISH, A.; FREESE, P.; FU, S.; FU, X. D.; FU, Y.; FUKUDA-YUZAWA, Y.; FULCINITI, M.; FUNNELL, A. P. W.; GABDANK, I.; GALEEV, T.; GAO, M.; GIRON, C. G.; GARVIN, T. H.; GELBOIN-BURKHART, C. A.; GEORGOLOPOULOS, G.; GERSTEIN, M. B.; GIARDINE, B. M.; GIFFORD, D. K.; GILBERT, D. M.; GILCHRIST, D. A.; GILLESPIE, S.; GINGERAS, T. R.; GONG, P.; GONZALEZ, A.; GONZALEZ, J. M.; GOOD, P.; GOREN, A.; GORKIN, D. U.; GRAVELEY, B. R.; GRAY, M.; GREENBLATT, J. F.; GRIFFITHS, E.; GROUDINE, M. T.; GRUBERT, F.; GU, M.; GUIGÓ, R.; GUO, H.; GUO, Y.; GUO, Y.; GURSOY, G.; GUTIERREZ-ARCELUS, M.; HALOW, J.; HARDISON, R. C.; HARDY, M.; HARIHARAN, M.; HARMANCI, A.; HARRINGTON, A.; HARROW, J. L.; HASHIMOTO, T. B.; HASZ, R. D.; HATAN, M.; HAUGEN, E.; HAYES, J. E.; HE, P.; HE, Y.; HEIDARI, N.; HENDRICKSON, D.; HEUSTON, E. F.; HILTON, J. A.; HITZ, B. C.; HOCHMAN, A.; HOLGREN, C.; HOU, L.; HOU, S.; HSIAO, Y. H. E.; HSU, S.; HUANG, H.; HUBBARD, T. J.; HUEY, J.; HUGHES, T. R.; HUNT, T.; IBARRIENTOS, S.; ISSNER, R.; IWATA, M.; IZUOGU, O.; JAAKKOLA, T.; JAMEEL, N.; JANSEN, C.; JIANG, L.; JIANG, P.; JOHNSON, A.; JOHNSON, R.; JUNGREIS, I.; KADABA, M.; KASOWSKI, M.; KASPARIAN, M.; KATO, M.; KAUL, R.; KAWLI, T.; KAY, M.; KEEN, J. C.; KELES, S.; KELLER, C. A.; KELLEY, D.; KELLIS, M.; KHERADPOUR, P.; KIM, D. S.; KIRILUSHA, A.; KLEIN, R. J.; KNOECHEL, B.; KUAN, S.; KULIK, M. J.; KUMAR, S.; KUNDAJE, A.; KUTYAVIN, T.; LAGARDE, J.; LAJOIE, B. R.; LAMBERT, N. J.; LAZAR, J.; LEE, A. Y.; LEE, D.; LEE, E.; LEE, J. W.; LEE, K.; LESLIE, C. S.; LEVY, S.; LI, B.; LI, H.; LI, N.; LI, X.; LI, Y. I.; LI, Y.; LI, Y.; LI, Y.; LIAN, J.; LIBBRECHT, M. W.; LIN, S.; LIN, Y.; LIU, D.; LIU, J.; LIU, P.; LIU, T.; LIU, X. S.; LIU, Y.; LIU, Y.; LONG, M.; LOU, S.; LOVELAND, J.; LU, A.; LU, Y.; LÉCUYER, E.; MA, L.; MACKIEWICZ, M.; MANNION, B. J.; MANNSTADT, M.; MANTHRAVADI, D.; MARINOV, G. K.; MARTIN, F. J.; MATTEI, E.; MCCUE, K.; MCEOWN, M.;

MCVICKER, G.; MEADOWS, S. K.; MEISSNER, A.; MENDENHALL, E. M.; MESSER, C. L.; MEULEMAN, W.; MEYER, C.; MILLER, S.; MILTON, M. G.; MISHRA, T.; MOORE, D. E.; MOORE, H. M.; MOORE, J. E.; MOORE, S. H.; MORAN, J.; MORTAZAVI, A.; MUDGE, J. M.; MUNSHI, N.; MURAD, R.; MYERS, R. M.; NANDAKUMAR, V.; NANDI, P.; NARASIMHA, A. M.; NARAYANAN, A. K.; NAUGHTON, H.; NAVARRO, F. C. P.; NAVAS, P.; NAZAROV, J.; NELSON, J.; NEPH, S.; NERI, F. J.; NERY, J. R.; NESMITH, A. R.; NEWBERRY, J. S.; NEWBERRY, K. M.; NGO, V.; NGUYEN, R.; NGUYEN, T. B.; NGUYEN, T.; NISHIDA, A.; NOBLE, W. S.; NOVAK, C. S.; NOVOA, E. M.; NUÑEZ, B.; O'DONNELL, C. W.; OLSON, S.; ONATE, K. C.; OTTERMAN, E.; OZADAM, H.; PAGAN, M.; PALDEN, T.; PAN, X.; PARK, Y.; PARTRIDGE, E. C.; PATEN, B.; PAULI-BEHN, F.; PAZIN, M. J.; PEI, B.; PENNACCHIO, L. A.; PEREZ, A. R.; PERRY, E. H.; PERVOUCHINE, D. D.; PHALKE, N. N.; PHAM, Q.; PHANSTIEL, D. H.; PLAJSER-FRICK, I.; PRATT, G. A.; PRATT, H. E.; PREISSEL, S.; PRITCHARD, J. K.; PRITYKIN, Y.; PURCARO, M. J.; QIN, Q.; QUINONES-VALDEZ, G.; RABANO, I.; RADOVANI, E.; RAJ, A.; RAJAGOPAL, N.; RAM, O.; RAMIREZ, L.; RAMIREZ, R. N.; RAUSCH, D.; RAYCHAUDHURI, S.; RAYMOND, J.; RAZAVI, R.; REDDY, T. E.; REIMONN, T. M.; REN, B.; REYMOND, A.; REYNOLDS, A.; RHIE, S. K.; RINN, J.; RIVERA, M.; RIVERA-MULIA, J. C.; ROBERTS, B.; RODRIGUEZ, J. M.; ROZOWSKY, J.; RYAN, R.; RYNES, E.; SALINS, D. N.; SANDSTROM, R.; SASAKI, T.; SATHE, S.; SAVIC, D.; SCAVELLI, A.; SCHEIMAN, J.; SCHLAFFNER, C.; SCHLOSS, J. A.; SCHMITGES, F. W.; SEE, L. H.; SETHI, A.; SETTY, M.; SHAFER, A.; SHAN, S.; SHARON, E.; SHEN, Q.; SHEN, Y.; SHERWOOD, R. I.; SHI, M.; SHIN, S.; SHORESH, N.; SIEBENTHALL, K.; SISU, C.; SLIFER, T.; SLOAN, C. A.; SMITH, A.; SNETKOVA, V.; SPACEK, D. V.; SRINIVASAN, S.; SRIVAS, R.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; STAMATOYANNOPOULOS, J. A.; STANTON, R.; STEFFAN, D.; STEHLING-SUN, S.; STRATTAN, J. S.; SU, A.; SUNDARARAMAN, B.; SUNER, M. M.; SYED, T.; SZYNKAREK, M.; TANAKA, F. Y.; TENEN, D.; TENG, M.; THOMAS, J. A.; TOFFEY, D.; TRESS, M. L.; TROUT, D. E.; TRYNKA, G.; TSUJI, J.; UPCHURCH, S. A.; URSU, O.; USZCZYNSKA-RATAJCZAK, B.; UZIEL, M. C.; VALENCIA, A.; BIBER, B. Van; VAN DER VELDE, A. G.; VAN NOSTRAND, E. L.; VAYDYLEVICH, Y.; VAZQUEZ, J.; VICTORSEN, A.; VIELMETTER, J.; VIERSTRA, J.; VISEL, A.; VLASOVA, A.; VOCKLEY, C. M.; VOLPI, S.; VONG, S.; WANG, H.; WANG, M.; WANG, Q.; WANG, R.; WANG, T.; WANG, W.; WANG, X.; WANG, Y.; WATSON, N. K.; WEI, X.; WEI, Z.; WEISSER, H.; WEISSMAN, S. M.; WELCH, R.; WELIKSON, R. E.; WENG, Z.; WESTRA, H. J.; WHITAKER, J. W.; WHITE, C.; WHITE, K. P.; WILDBERG, A.; WILLIAMS, B. A.; WINE, D.; WITT, H. N.; WOLD, B.; WOLF, M.; WRIGHT, J.; XIAO, R.; XIAO, X.; XU, J.; XU, J.; YAN, K. K.; YAN, Y.; YANG, H.; YANG, X.; YANG, Y. W.; YARDIMCI, G. G.; YEE, B. A.; YEO, G. W.; YOUNG, T.; YU, T.; YUE, F.; ZALESKI, C.; ZANG, C.; ZENG, H.; ZENG, W.; ZERBINO, D. R.; ZHAI, J.; ZHAN, L.; ZHAN, Y.; ZHANG, B.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; ZHANG, K.; ZHANG, L.; ZHANG, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, X. O.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; ZHAO, Y.; ZHENG, Y.; ZHONG, G.; ZHOU, X. Q.; ZHU, Y.; ZIMMERMAN, J.; SNYDER, M. P.; GINGERAS, T. R.; MOORE, J. E.; WENG, Z.; GERSTEIN, M. B.; REN, B.; HARDISON, R. C.; STAMATOYANNOPOULOS, J. A.; GRAVELEY, B. R.; FEINGOLD, E. A.; PAZIN, M. J.; PAGAN, M.; GILCHRIST, D. A.; HITZ, B. C.; CHERRY, J. M.; BERNSTEIN, B. E.; MENDENHALL, E. M.; ZERBINO, D. R.; FRANKISH, A.; FLICEK, P.; MYERS, R. M. Perspectives on ENCODE. *Nature*, v. 583, n. 7818, p. 693–698, 2020.

ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D. R. P. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Maryland Heights, v. 379, n. 2, p. 173-182, 2000. DOI: 10.1006/abbi.2000.1880.

AGARWAL, V.; BELL, G. W.; NAM, J.-W.; BARTEL, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, Cambridge, v. 4, artigo e05005, 38 p., 2015. DOI: 10.7554/eLife.05005.

ALEXANDER, J. H. Bull breeding soundness evaluation: A practitioner's perspective. *Theriogenology*, v. 70, n. 3, p. 469-472, 2008. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.05.030

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, Irvine, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, London, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 2004. DOI: 10.1038/nature02871.

ASLAM, M.; LADILOV, Y. Emerging role of cAMP/AMPK signaling. *Cells*, Basel, v. 11, n. 2, artigo 308, 15 p., 2022. DOI: 10.3390/cells11020308.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE ZEBU. *Raças Zebuínas*. Uberaba, 2023. Disponível em: <https://www.abcz.org.br/>. Acesso em: 16 jun. 2023.

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE BRAHMAN DO BRASIL. *A História da Raça Brahman*. Uberaba, 2023. Disponível em: <https://www.brahman.com.br/>. Acesso em: 16 jun. 2023.

BARTEL, D. P. Metazoan microRNAs. *Cell*, Cambridge, v. 173, n. 1, p. 20-51, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.006.

BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*, New York, v. 324, n. 5926, p. 522-528, abr. 2009. DOI: 10.1126/science.1169588.

BUHLING, K.; SCHUMACHER, A.; EULENBURG, C. Z.; LAAKMANN, E. Influence of oral vitamin and mineral supplementation on male infertility: a meta-analysis and systematic review. *Reproductive BioMedicine Online*, Oxford, v. 39, n. 2, p. 269-279, 2019. DOI: 10.1016/j.rbmo.2019.03.099.

BURROW, H. M. Importance of adaptation and genotype × environment interactions in tropical beef breeding systems. *Animal*, Cambridge, v. 6, n. 5, p. 729-740, 2012. DOI: 10.1017/S175173111200002X.

BUSHATI, N.; COHEN, S. M. microRNA functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Palo Alto, v. 23, n. 1, p. 175-205, 2007. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406.

BUTLER, M. L.; BORMANN, J. M.; WEABER, R. L.; GRIEGER, D. M.; ROLF, M. M. Selection for bull fertility: a review. *Translational Animal Science*, Washington, v. 4, n. 1, p. 423-441, 2020. DOI: 10.1093/tas/txz174.

CAMPO-PAYSAA, F.; SÉMON, M.; CAMERON, R. A.; PETERSON, K. J.; SCHUBERT, M. microRNA complements in deuterostomes: origin and evolution of microRNAs. *Evolution and Development*, Heidelberg, v. 13, n. 1, p. 15-27, 2011. DOI: 10.1111/j.1525-142X.2010.00452.x.

CARDOSO, F. F.; MATIKA, O.; DJIKENG, A.; MAPHOLI, N.; BURROW, H. M.; YOKOO, M. J. I.; CAMPOS, G. S.; GULIAS-GOMES, C. C.; RIGGIO, V.; PONG-WONG, R.; ENGLE, B.; PORTO-NETO, L.; MAIWASCHE, A.; HAYES, B. J. Multiple country and breed genomic prediction of tick resistance in beef cattle. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 12, artigo 620847, 11 p., 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.620847.

CHEN, X.; LI, X.; GUO, J.; ZHANG, P.; ZENG, W. The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1186/s40104-017-0166-4.

CHENOWETH, P. J. Aspects of reproduction in female *Bos indicus* cattle: a review. *Australian Veterinary Journal*, Chichester, v. 71, n. 12, p. 422-426, 1994. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1994.tb00961.x.

CHENOWETH, P. J.; MCPHERSON, F. J. Bull breeding soundness, semen evaluation and cattle productivity. *Animal Reproduction Science*, v. 169, p. 32–36, 2016. DOI: DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.03.001.

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, Oxford, v. 15, n. 2, p. 213-227, 2009. DOI: 10.1093/humupd/dmn055.

CUNNINGHAM, F.; ALLEN, J. E.; ALLEN, J.; ALVAREZ-JARRETA, J.; AMODE, M. R.; ARMEAN, I. M.; AUSTINE-ORIMOLOYE, O.; AZOV, A. G.; BARNES, I.; BENNETT, R.; BERRY, A.; BHAI, J.; BIGNELL, A.; BILLIS, K.; BODDU, S.; BROOKS, L.; CHARKHCHI, M.; CUMMINS, C.; FIORETTO, L. R.; DAVIDSON, C.; DODIYA, K.; DONALDSON, S.; HOUDAIGUI, B. E.; NABOULSI, T. E.; FATIMA, R.; GIRON, C. G.; GENEZ, T.; MARTINEZ, J. G.; GUIJARRO-CLARKE, C.; GYMER, A.; HARDY, M.; HOLLIS, Z.; HOURLIER, T.; HUNT, T.; JUETTEMANN, T.; KAIKALA, V.; KAY, M.; LAVIDAS, I.; LE, T.; LEMOS, D.; MARUGÁN, J. C.; MOHANAN, S.; MUSHTAQ, A.; NAVEN, M.; OGEH, D. N.; PARKER, A.; PARTON, A.; PERRY, M.; PILIŽOTA, I.; PROSOVETSKAIA, I.; SAKTHIVEL, M. P.; SALAM, A. I. A.; SCHMITT, B. M.; SCHUILENBURG, H.; SHEPPARD, D.; PÉREZ-SILVA, J. G.; STARK, W.; STEED, E.; SUTINEN, K.; SUKUMARAN, R.; SUMATHIPALA, D.; SUNER, M.-M.; SZPAK, M.; THORMANN, A.; TRICOMI, F. F.; URBINA-GÓMEZ, D.; VEIDENBERG, A.; WALSH, T. A.; WALT, S. B.; WILLHOFT, N.; WINTERBOTTOM, A.; WASS, E.; CHAKIACHVILI, M.; FLINT, B.; FRANKISH, A.; GIORGETTI, S.; HAGGERTY, L.; HUNT, S. E.; IISLEY, G. R.; LOVELAND, J. E.; MARTIN, F. J.; MOORE, B.; MUDGE, J. M.; MUFFATO, M.;

PERRY, E.; RUFFIER, M.; TATE, J.; THYBERT, D.; TREVANION, S. J.; DYER, S.; HARRISON, P. W.; HOWE, K. L.; YATES, A. D.; ZERBINO, D. R.; FLICEK, P. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*, London, v. 50, n. D1, p. D988-D995, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkab1049.

ENCODE PROJECT CONSORTIUM. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, London, v. 489, n. 7414, p. 57-74, 2012. DOI: 10.1038/nature11247.

FAYRER-HOSKEN, R. Anatomy and physiology of the bull's reproductive system. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 195-202, 1997. DOI: 10.1016/S0749-0720(15)30335-2.

FEINGOLD, E. A.; GOOD, P. J.; GUYER, M. S.; KAMHOLZ, S.; LIEFER, L.; WETTERSTRAND, K.; COLLINS, F. S.; ENCODE PROJECT CONSORTIUM. The ENCODE (ENCyclopedia of DNA Elements) project. *Science*, New York, v. 306, n. 5696, p. 636-640, 2004. DOI: 10.1126/science.1105136.

FORTES, M. R.S.; DEATLEY, K. L.; LEHNERT, S. A.; BURNS, B. M.; REVERTER, A.; HAWKEN, R. J.; BOE-HANSEN, G.; MOORE, S. S.; THOMAS, M. G. Genomic regions associated with fertility traits in male and female cattle: advances from microsatellites to high-density chips and beyond. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 141, n. 1-2, 19 p., 2013. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.07.002.

FORTES, M. R. S.; SATAKE, N.; CORBET, D. H.; CORBET, N. J.; BURNS, B. M.; MOORE, S. S.; BOE-HANSEN, G. B. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in *Bos indicus* bulls. *Andrology*, Sharjah, v. 2, n. 3, p. 370-378, 2014. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2014.00196.x.

FORTES, M. R. S.; PORTO-NETO, L. R.; SATAKE, N.; NGUYEN, L. T.; FREITAS, A. C.; MELO, T. P.; SCALEZ, D. C. B.; HAYES, B.; RAIDAN, F. S. S.; REVERTER, A.; BOE-HANSEN, G. B. X chromosome variants are associated with male fertility traits in two bovine populations. *Genetics Selection Evolution*, v. 52, n. 1, p. 1–13, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00563-5>.

FRIEDLÄNDER, M. R.; MACKOWIAK, S. D.; LI, N.; CHEN, W.; RAJEWSKY, N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Research*, London, v. 40, n. 1, p. 37-52, 2012. DOI: 10.1093/nar/gkr688.

GEBREMEDHN, S.; SALILEW-WONDIM, D.; AHMAD, I.; SAHADEVAN, S.; HOSSAIN, M. M.; HOELKER, M.; RINGS, F.; NEUHOFF, C.; THOLEN, E.; LOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. MicroRNA expression profile in bovine granulosa cells of preovulatory dominant and subordinate follicles during the late follicular phase of the estrous cycle. *PLoS One*, San Francisco, v. 10, n. 5, artigo e0125912, 26 p., 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0125912.

GIBB, Z.; GRIFFIN, R. A.; AITKEN, R. J.; IULIIS, G. N. Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 220, artigo 106456, 13 p., 2020. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106456.

GIUFFRA, E.; TUGGLE, C. K.; ARCHIBALD, A. L.; ACLOQUE, H.; CHAMBERLAIN, A. J.; COCHRANE, G.; DAETWYLER, H. D.; QUELEN, S. D.; EORY, L.; FOISSAC, S.; GODDARD, M. E.; GROENEN, M. A. M.; HALSTEAD, M.; HARRISON, P. W.; HAYES, B. J.; KERN, C.; KHATIB, H.; KUO, R. I.; MACHUGH, D. E.; MACLEOD, I. M.; MADSEN, O.; REECY, M. J.; ROSS, P. J.; WATSON, M.; WELLS, J. M.; ZHOU, H. J. Functional annotation of animal genomes (FAANG): current achievements and roadmap. *Annual Review of Animal Biosciences*, Palo Alto, v. 7, p. 65-88, 2019. DOI: 10.1146/annurev-animal-020518-114913.

GLAZOV, E. A.; KONGSUWAN, K.; ASSAVALAPSAKUL, W.; HORWOOD, P. F.; MITTER, N.; MAHONY, T. J. Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection. *PLoS One*, San Francisco, v. 4, n. 7, 5 p., 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0006349.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Genomic selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, Berlin, v. 124, n. 6, p. 323-330, 2007. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2007.00702.x.

GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, London, v. 34, p. D140-D144, 2006. DOI: 10.1093/nar/gkj112.

GRIFFITHS-JONES, S.; SAINI, H. K.; DONGEN, S.; ENRIGHT, A. J. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, London, v. 36, p. D154-D158, 2008. DOI: 10.1093/nar/gkm952.

GRIFFITHS-JONES, S. The microRNA registry. *Nucleic Acids Research*, London, v. 32, p. D109-D111, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh023.

HANSEN, J. C.; DEGUCHI, Y. Selenium and fertility in animals and man: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, London, v. 37, n. 1, p. 19-30, 1996.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 82-83, p. 349-360, 2004. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.011.

HU, Z. L.; PARK, C. A.; REECY, J. M. Bringing the animal QTLdb and CorrDB into the future: meeting new challenges and providing updated services. *Nucleic Acids Research*, London, v. 50, n. D1, p. D956-D961, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkab1116.

HUANG, J.; JU, Z.; LI, Q.; HOU, Q.; WANG, C.; LI, J.; LI, R.; WANG, L.; SUN, T.; HANG, S.; GAO, Y.; HOU, M.; ZHONG, J. Solexa sequencing of novel and differentially expressed microRNAs in testicular and ovarian tissues in holstein cattle. *International Journal of Biological Sciences*, Sidney, v. 7, n. 7, p. 1016-1026, 2011. DOI: 10.7150/ijbs.7.1016.

HUANG, Y.; ZHANG, I.; SUN, X. Identification of differentially expressed miRNAs on normal cell, fatty liver cell and processed cell by monoammonium glycyrrhizinate from cattle (*Bos indicus*) by deep sequencing approach. *Animal Biotechnology*, New York, v. 32, n. 6, p. 688-698, 2021. DOI: 10.1080/10495398.2020.1744617.

HUMPHREYS, D. T.; HYNES, C. J.; PATEL, H. R.; WEI, G. H.; CANNON, L.; FATKIN, D.; SUTER, C. M.; CLANCY, J. L.; PREISS, T. Complexity of murine cardiomyocyte miRNA biogenesis, sequence variant expression and function. *PLoS One*, San Francisco, v. 7, n. 2, artigo e30933, 18 p., 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0030933.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção de Bovinos abatidos, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 16 jun. 2023.

KABEKKODU, S. P.; SHUKLA, V.; VARGHESE, V. K.; D'SOUZA, J.; CHAKRABARTY, S.; SATYAMOORTHY, K. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biological Reviews*, Chichester, v. 93, n. 4, p. 1955-1986, 2018. DOI: 10.1111/brv.12428.

KANEHISA, M.; FURUMICHI, M.; SATO, Y.; ISHIGURO-WATANABE, M.; TANABE, M. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*, London, v. 49, n. D1, p. D545-D551, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkaa970.

KAROLCHIK, D.; HINRICHS, A. S.; KENT, W. J. The UCSC genome browser. *Current Protocols in Human Genetics*, Hoboken, v. 71, n. 1, 2011. DOI: 10.1002/0471142905.hg1806s71.

KENT, W. J.; SUGNET, C. W.; FUREY, T. S.; ROSKIN, K. M.; PRINGLE, T. H.; ZAHLER, A. M.; HAUSSLER, D. The human genome browser at UCSC. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, v. 12, p. 996-1006, 2002. DOI: 10.1101/gr.229102.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, London, v. 47, p. D155-D162, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1141.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, London, v. 42, p. D68-D73, 2014. DOI: 10.1093/nar/gkt1181.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, London, v. 39, p. D152-D157, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkq1027.

KRETZER, D. M.; LOVELAND, K. L.; MEINHARDT, A.; SIMORANGKIR, D.; WREFORD, N. Spermatogenesis. *Human Reproduction*, Oxford, v. 13, 8 p., 1998. Supl. 1. DOI: 10.1093/humrep/13.suppl_1.1

KRÜGER, J.; REHMSMEIER, M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Research*, London, v. 34, p. W451-W454, 2006. DOI: 10.1093/nar/gkl243.

LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, London, v. 10, n. 3, p. R25.1-R25.10, 2009. DOI: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.

LAWLESS, N.; FOROUSHANI, A. B. K.; MCCABE, M. S.; O'FARRELLY, C. O.; LYNN, D. J. Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a gram-positive bacterial infection. *PLoS One*, San Francisco, v. 8, n. 3, artigo e57543, 13 p., 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0057543.

LI, R.; BEAUDOIN, F.; AMMAH, A. A.; BISSONNETTE, N.; BENCHAAR, C.; ZHAO, X.; LEI, C.; IBEAGHA-AWEMU, E. M. Deep sequencing shows MicroRNA involvement in bovine mammary gland adaptation to diets supplemented with linseed oil or safflower oil. *BMC Genomics*, London, v. 16, artigo 884, 16 p., 2015. DOI: 10.1186/s12864-015-1965-7.

LIMA, A. O.; AFONSO, J.; EDSON, J.; MARCELLIN, E.; PALLFREYNAN, R.; PORTONETO, L. R.; REVERTER, A.; FORTES, M. R. S. Network analyses predict small RNAs that might modulate gene expression in the testis and epididymis of bos indicus bulls. *Frontiers in Genetics*, Lausanne, v. 12, artigo 610116, 14 p, 2021. DOI: 10.3389/fgene.2021.610116.

LIU, X.; ZHAO, H.; LI, W.; BAO, H.; QU, Q.; MA, D. Up-regulation of miR-145 may contribute to repeated implantation failure after IVF–embryo transfer by targeting PAI-1. *Reproductive BioMedicine Online*, Oxford, v. 40, n. 5, p. 627-636, 2020. DOI: 10.1016/j.rbmo.2020.01.018.

LUO, Y.; HITZ, B.; GABDANK, I.; HILTON, J. A.; KAGDA, M. S.; LAM, B.; MYERS, Z.; SUD, P.; JOU, J.; LIN, K.; BAYMURADOV, U. K.; GRAHAM, K.; LITTON, C.; MIYASATO, S. R.; STRATTAN, J. S.; JOLANKI, O.; LEE, J.-W.; TANAKA, F. Y.; ADENEKAN, P.; O'NEILL, E.; CHERRY, J. M. New developments on the encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) data portal. *Nucleic Acids Research*, London, v. 48, n. D1, p. D882-D889, 2020. DOI: 10.1093/nar/gkz1062.

MARENGO, S. R. Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 105, n. 1-2), p. 52-63, 2008. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.018.

MATUKUMALLI, L. K.; LAWLEY, C. T.; SCHNABEL, R. D.; TAYLOR, J. F.; ALLAN, M. F.; HEATON, M. P.; CONNELL, J. O.; MOORE, S. S.; SMITH, T. P. L.; SONSTEGARD, T. S.; TASSELL, C. P. Van. Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. *PLoS One*. v. 4, n. 4, p. e5350, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0005350.

MCGEARY, S. E.; LIN, K. S.; SHI, C. Y.; PHAM, T. M.; BISARIA, N.; KELLEY, G. M.; BARTEL, D. P. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science*, New York, v. 366, n. 6472, artigo eaav1741, 30 p., 2019. DOI: 10.1126/science.aav1741.

MEHDI, Y.; DUFRASNE, I. Selenium in cattle: a review. *Molecules*, Basel, v. 21, n. 4, artigo 545, 14 p., 2016. DOI: 10.3390/molecules21040545.

MENEZES, E. B.; VELHO, A. L. C.; SANTOS, F.; DINH, T.; KAYA, A.; TOPPER, E.; MOURA, A. A.; MEMILI, E. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. *BMC Genomics*, London, v. 20, n. 1, artigo 714, 16 p. , 2019. DOI: 10.1186/s12864-019-6074-6.

MENON, K. M. J.; MENON, B.; GULAPPA, T. Regulation of luteinizing hormone receptor mRNA expression in the ovary: the role of miR-122. *Vitamins and Hormones*, San Diego, v. 107, p. 67-87, 2018. DOI: 10.1016/bs.vh.2018.01.010.

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; MEYER, P. M.; RODRIGUES, P. H. M.; ARRIGONI, M. B. Current outlook and future perspectives of beef production in Brazil. *Animal Frontiers*, Cary, v. 1, n. 2, p. 46-52, 2011. DOI: 10.2527/af.2011-0017.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, Cary, v. 32, n. 1, p. 81-151, 2011. DOI: 10.1210/er.2010-0013.

MOHR, A. M.; MOTT, J. L. Overview of microRNA biology. *Seminars in Liver Disease*, New York, v. 35, n. 1, p. 3-11, 2015. DOI: 10.1055/s-0034-1397344.

MORRELL, J. M. Heat stress and bull fertility. *Theriogenology*, Philadelphia, v. 153, p. 62-67, 2020. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.05.014.

MUROYA, S.; TANIGUCHI, M.; SHIBATA, M.; OE, M.; OJIMA, K.; NAKAJIMA, I.; CHIKUNI, K. Profiling of differentially expressed microrna and the bioinformatic target gene analyses in bovine fast- and slow-type muscles by massively parallel sequencing. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 91, n. 1, p. 90-103, 2013. DOI: 10.2527/jas.2012-5371.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, Cary, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001. DOI: 10.1210/edrv.22.3.0431.

OLENA, A. F.; PATTON, J. G. Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology*, Hoboken, v. 222, n. 3, p. 540-545, 2010. DOI: 10.1002/jcp.21993.

PORTO-NETO, L. R.; REVERTER, A.; PRAYAGA, K. C.; CHAN, E. K. F.; JOHNSTON, D. J.; HAWKEN, R. J.; FORDYCE, G.; GARCIA, J. F.; SONSTEGARD, T. S.; BOLORMAA, S.; GODDARD, M. E.; BURROW, H. M.; HENSHALL, J. M.; LEHNERT, S. A.; BARENDSE, W. the genetic architecture of climatic adaptation of tropical cattle. *PLoS One*, San Francisco, v. 9, n. 11, artigo e113284, 22 p., 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0113284.

PUENTE, M. A.; TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Bull sperm acrosome reaction induced by gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABAergic receptors type A. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 127, n. 1-2, p. 31-37, 2011. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2011.07.001.

RAUDVERE, U.; KOLBERG, L.; KUZMIN, I.; ARAK, T.; ADLER, P.; PETERSON, H.; VILO, J. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of

gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Research*, London, v. 47, n. W1, p. W191-w198, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz369.

REZA, A. M. M. T.; CHOI, Y.-J.; HAN, S. G.; PARK, C.; HONG, K.; KIM, J. H. Roles of microRNAs in mammalian reproduction: from the commitment of germ cells to peri-implantation embryos. *Biological Reviews*, Chichester, v. 94, n. 2, p. 415-438, 2019. DOI: 10.1111/brv.12459.

SALAS-HUETOS, A.; ROSIQUE-ESTEBAN, N.; BECERRA-TOMÁS, N.; VIZMANOS, B.; BULLÓ, M.; SALAS-SALVADÓ, J. The effect of nutrients and dietary supplements on sperm quality parameters: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Advances in Nutrition*, Bethesda, v. 9, n. 6, p. 833-848, 2018. DOI: 10.1093/advances/nmy057.

SAYERS, E. W.; BOLTON, E. E.; BRISTER, J. R.; CANESE, K.; CHAN, J.; COMEAU, D. C.; CONNOR, R.; FUNK, K.; KELLY, C.; KIM, S.; MADEJ, T.; MARCHLER-BAUER, A.; LANCZYCKI, C.; LATHROP, S.; LU, Z.; THIBAUD-NISSEN, F.; MURPHY, T.; PHAN, L.; SKRIPCHENKO, Y.; TSE, T.; WANG, J.; WILLIAMS, R.; TRAWICK, B. W.; PRUITT, K. D.; SHERRY, S. T. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, London, v. 50, n. D1, p. D20-D26, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkab1112.

SELLEM, E.; MARTHEY, S.; RAU, A.; JOUNEAU, L.; BONNET, A.; LE DANVIC, C.; GUYONNET, B.; KIEFER, H.; JAMMES, H.; SCHIBLER, L. Dynamics of cattle sperm sncRNAs during maturation, from testis to ejaculated sperm. *Epigenetics and Chromatin*, v. 14, n. 1, p. 1–18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00397-5>.

SHAMIMUZZAMAN, M.; LE TOURNEAU, J. J.; UNNI, D. R.; DIESH, C. M.; TRIANT, D. A.; WALSH, A. T.; TAYAL, A.; CONANT, G. C.; HAGEN, D. E.; ELSIK, C. G. Bovine Genome Database: New annotation tools for a new reference genome. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n. D1, p. D676–D681, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz944>.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003. DOI: 10.1101/gr.1239303.

SONG, R.; RO, S.; MICHAELS, J. D.; PARK, C.; MCCARREY, J. R.; YAN, W. Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation. *Nature Genetics*, New York, v. 41, n. 4, p. 488-493, 2009. DOI: 10.1038/ng.338.

SOUSA, M. A. P.; ATHAYDE, F. R. F.; MALDONADO, M. B. C.; LIMA, A. O.; FORTES, M. R. S.; LOPES, F. L. Single nucleotide polymorphisms affect miRNA target prediction in bovine. *PLoS One*, San Francisco, v. 16, artigo e0249406, 17 p., 4 abr. 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0249406.

STAUB, C.; JOHNSON, L. Review: spermatogenesis in the bull. *Animal*, Cambridge, v. 12, p. s27-s35, 2018. Supl. 1. DOI: 10.1017/S1751731118000435.

TAYLOR, J. F.; SCHNABEL, R. D.; SUTOVSKY, P. Review: genomics of bull fertility. *Animal*, Cambridge, v. 12, p. s172-s183, 2018. Supl. 1. DOI: 10.1017/S1751731118000599.

THE LANCET. Cracking ENCODE. *The Lancet*, London, v. 380, n. 9846, p. 950, 2012. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61520-7.

TIEDJE, K. E.; STEVENS, K.; BARNES, S.; WEAVER, D. F. B-alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochemistry International*, London, v. 57, n. 3, p. 177-188, 2010. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.06.001.

UTSUNOMIYA, Y. T.; MILANESI, M.; FORTES, M. R. S.; PORTO-NETO, L. R.; UTSUNOMIYA, A. T. H.; SILVA, M. V. G. B.; GARCIA, J. F.; AJMONE-MARSAN, P. Genomic clues of the evolutionary history of bos indicus cattle. *Animal Genetics*, Chichester, v. 50, n. 6, p. 557-568, 2019. DOI: 10.1111/age.12836.

WARD, W. S.; COVEY, D. S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction*, Cary, v. 44, p. 569-574, 1991. DOI: 10.1095/biolreprod44.4.569.

YE, D.; SHEN, Z.; ZHOU, S. Function of microRNA-145 and mechanisms underlying its role in malignant tumor diagnosis and treatment. *Cancer Management and Research*, Macclesfield, v. 11, p. 969-979, 2019. DOI: 10.2147/CMAR.S191696.

YLIOJA, C. M.; ROLF, M. M.; MAMEDOVA, L. K.; BRADFORD, B. J. Associations between body condition score at parturition and microrna profile in colostrum of dairy cows as evaluated by paired mapping programs. *Journal of Dairy Science*, New York, v. 102, n. 12, p. 11609-11621, 2019. DOI: 10.3168/jds.2019-16675.

ZACCOLO, M.; ZERIO, A.; LOBO, M. J. Subcellular organization of the cAMP signaling pathway. *Pharmacological Reviews*, Rockville, v. 73, n. 1, p. 278-309, 2021. DOI: 10.1124/pharmrev.120.000086.

ZHANG, Y.-Y.; WHANG, H.-B.; WANG, Y.-N.; WANG, H.-C.; ZHANG, S.; HONG, J.-H.; GUO, H.-F.; CHEN, D.; YANG, Y.; ZAN, L.-S. Transcriptome analysis of mRNA and microRNAs in intramuscular fat tissues of castrated and intact male Chinese Qinchuan cattle. *PLoS One*, San Francisco, v. 12, n. 10, artigo e0185961, 25 p., 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0185961.

ZHAO, W.; QUANSAH, E.; YUAN, M.; GOU, Q.; MENGAL, K.; LI, P.; WU, S.; XU, C.; YI, C.; CAI, X. Region-specific gene expression in the epididymis of Yak. *Theriogenology*, Philadelphia, v. 139, p. 132-146, 2019. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.08.006.

APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1 - Caracterização dos loci dos novos miRNAs em tecido testicular de *Bos indicus*

(continua)

Id provisória	Tecido	Fita do miRNA	Região	Gene	Fita do gene	Descrição
1_138819324..138819399:+	Caput / Cauda do epidídimo	+	Intrônico	NEK11	-	Quinase relacionada a NIMA 11
2_15532578..15532636:+	Caput / Cauda do epidídimo	+	Intergênico			
3_784	Caput do epidídimo	+	Intergênico			
3_679	Caput do epidídimo	+	Intrônico	SNX27	-	Nexina de ordenação 27
9_950	Cauda do epidídimo	+	Intergênico			
3_969	Cauda do epidídimo	+	Intrônico	CYP4A11	+	Citocromo P450, família 4, subfamília A, polipeptídeo 11
3_971	Cauda do epidídimo	+	Intrônico	ENSBTAT00000021785.6, ENSBTAT00000017936.6	+	Novo transcrito
3_841	Cauda do epidídimo	+	Intrônico	SNX27	+	Nexina de ordenação 27
4_1168	Caput do epidídimo	+	Intergênico			
4_1052	Caput do epidídimo	+	Intrônico	ANKIB1	+	Proteína 1 contendo domínio de repetição de anquirina e domínio IBR

(continuação)

Id provisória	Tecido	Fita do miRNA	Região	Gene	Fita do gene	Descrição
4_1522	Cauda do epidídimo	-	Intrônico	<i>COPG2</i>	-	Subunidade gama-2 do coatômero
5_1575	Cauda do epidídimo	+	Intergênico			
5_1643	Cauda do epidídimo	+	Intrônico	<i>XPOT, C5H12orf56</i>	+ / -	Exportina-T, homólogo C12orf56 do cromossomo 5
5_1621	Cauda do epidídimo	+	Intrônico	<i>HDAC7</i>	+	Histona desacetilase 7
5_1992	Cauda do epidídimo	-	miRNA / Intrônico	<i>MIR2285BE / EPS8</i>	+ / +	Substrato 8 da via do receptor de fator de crescimento epidérmico
6_70996242..70996302:+	Caput / Cauda do epidídimo / Parênquima testicular	+	Intrônico	<i>PDCL2</i>	-	Proteína semelhante à fosducina 2
6_2271	Cauda do epidídimo	+	Intrônico	<i>ARHGAP24</i>	+	Proteína ativadora de GTPase Rho 24
7_6019	Parênquima testicular	+	Intrônico	<i>KLF16</i>	-	Fator semelhante ao Krueppel 16
7_18947021..18947082:+	Caput / Cauda do epidídimo	+	Intrônico	<i>PTPRS</i>	+	Pré-curso do receptor de tirosina fosfatase de proteína tipo S
7_2774	Cauda do epidídimo	-	Intergênico			

(continuação)

Id provisória	Tecido	Fita do miRNA	Região	Gene	Fita do gene	Descrição
8_7305	Parênquima testicular	+	Intrônico	<i>NTRK2</i>	+	Precursor do receptor de tirosina fosfatase tipo S
8_6850	Parênquima testicular	+	Intergênico			
8_23350616..23350672:+	<i>Caput / Cauda</i> do epidídimo	+	Intergênico			
8_3031	<i>Cauda</i> do epidídimo	+	Intrônico	<i>PDCD1LG2</i>	-	Ligante 2 do receptor de morte celular programada 1
8_3069	<i>Cauda</i> do epidídimo	+	Intrônico	<i>NTRK2</i>	+	Precursor do receptor de fatores de crescimento
9_24479804..24479866:-	<i>Caput / Cauda</i> do epidídimo	-	Intergênico			
9_3582	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Intrônico	<i>SASH1</i>	+	Proteína 1 contendo domínio SAM e SH3
11_10650	Parênquima testicular	+	Intrônico	<i>NBAS</i>	+	Sequência amplificada de neuroblastoma
11_4620	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Intergênico			
11_4355	<i>Cauda</i> do epidídimo	+	Intrônico	<i>CTNNA2</i>	-	Catena alfa 2
11_4277	<i>Cauda</i> do epidídimo	+	Intergênico			
12_61147642..61147701:-	<i>Caput / Cauda</i> do epidídimo	-	Intergênico			

(continuação)

Id provisória	Tecido	Fita do miRNA	Região	Gene	Fita do gene	Descrição
12_21090260..21090309:+	<i>Caput / Cauda</i> do epidídimo	+	Intrônico	<i>WDFY2</i>	+	Proteína 2 contendo domínio WD e domínio FYVE
12_4895	<i>Cauda</i> do epidídimo	+	Intrônico	<i>CLYBL</i>	+	Semelhante à beta citrato liase
12_4952	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Intrônico	<i>CAB39L</i>	-	Semelhante à proteína 39 de ligação ao cálcio
12_5002	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Intergênico			
13_13432	Parênquima testicular	-	Intrônico	<i>PCK1</i>	-	Fosfoenolpiruvato carboxicinase 1
14_14106	Parênquima testicular	-	Intrônico	<i>ENSBTAG00000046739.2</i>	+	
14_13966	Parênquima testicular	+	Intrônico	<i>NKAIN3</i>	+	Interactor 3 da ATPase de transporte de sódio/potássio
14_4742	<i>Caput</i> do epidídimo	+	Intrônico	<i>DPYS</i>	+	Dihidropirimidinase
14_5624	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Intergênico			
14_5481	<i>Cauda</i> do epidídimo	+	Intergênico			
14_5439	<i>Cauda</i> do epidídimo	+	Intergênico			
14_5626	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Intrônico	<i>DPYS</i>	+	Dihidropirimidinase
15_5852	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Intergênico			
16_16073	Parênquima testicular	-	Intergênico			
17_16492	Parênquima testicular	+	Intrônico	<i>RBM19</i>	+	Proteína 19 do motif de ligação ao RNA

(continuação)

Id provisória	Tecido	Fita do miRNA	Região	Gene	Fita do gene	Descrição
17_6498	<i>Cauda</i> do epidídimo	+	Intrônico	<i>RBM19</i>	+	Proteína 19 do motif de ligação ao RNA
18_6137	<i>Caput</i> do epidídimo	+	Intergênico			
18_6318	<i>Caput</i> do epidídimo	-	Intergênico			
18_7286	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Intergênico			
19_20108	Parênquima testicular	-	Intergênico			
19_7768	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Intrônico	<i>LASP1</i>	+	Proteína 1 LIM e SH3
19_7870	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Intergênico			
21_22317	Parênquima testicular	+	Exon	<i>ENSBTAG00000054619.1</i>	-	MicroRNA 203b
21_68645104..68645164:-	<i>Caput</i> do epidídimo / Parênquima testicular	-	Exon	<i>ENSBTAG00000054619.1</i>	-	MicroRNA 203b
21_68645106..68645167:+	<i>Caput</i> / <i>Cauda</i> do epidídimo	+	Exon	<i>ENSBTAG00000054619.1</i>	-	MicroRNA 203b
21_8692	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Exon	<i>ENSBTAG00000054619.1</i>	-	MicroRNA 203b
21_8598	<i>Cauda</i> do epidídimo	-	Intrônico	<i>SV2B</i>	-	Glicoproteína 2B da vesícula sináptica
21_8331	<i>Cauda</i> do epidídimo	+	Intergênico			
22_23568	Parênquima testicular	+	Intergênico			
23_8301	<i>Caput</i> do epidídimo	-	Exon	<i>HSPA1A</i>	-	Proteína de choque térmico da família A (Hsp70) membro 1A
23_9131	<i>Cauda</i> do epidídimo	+	Intergênico			
24_8649	<i>Caput</i> do epidídimo	-	Exon	<i>MIR122</i>	+	MicroRNA 122

(continuação)

Id provisória	Tecido	Fita do miRNA	Região	Gene	Fita do gene	Descrição
26_8980	Caput do epidídimo	-	Intrônico	EIF3A	-	Subunidade A do fator de iniciação da tradução eucariótica 3
26_8883	Caput do epidídimo	+	Intrônico	HPSE2	-	Heparanase 2 (inativo)
26_10166	Cauda do epidídimo	-	Intergênico			
26_10146	Cauda do epidídimo	+	Intergênico			
(conclusão)						
26_10083	Cauda do epidídimo	+	Intrônico	HPSE2	-	Heparanase 2 (inativo)
27_27890	Parênquima testicular	-	Intrônico	LRR3B	-	Contendo repetições ricas em leucina 3B
28_9211	Caput do epidídimo	+	Exon	MIR6533	-	Bos taurus microRNA 6533
28_10463	Cauda do epidídimo	+	Exon	MIR6533	-	Bos taurus microRNA 6533
29_12872752..12872814:+	Caput do epidídimo / Parênquima testicular	+	Intergênico			
29_10810	Cauda do epidídimo	-	Intergênico			
X_30184	Parênquima testicular	-	Intergênico			
X_30192	Parênquima testicular	-	Intergênico			
X_9776	Caput do epidídimo	+	Intergênico			
X_9878	Caput do epidídimo	-	Intergênico			
X_9801	Caput do epidídimo	+	Intrônico	CTPS2	+	Sintase CTP 2
X_9795	Caput do epidídimo	+	Intergênico			
X_9984	Caput do epidídimo	-	Intergênico			

(conclusão)

Id provisória	Tecido	Fita do miRNA	Região	Gene	Fita do gene	Descrição
X_9968	Caput do epidídimo	-	Intrônico	ENSBTAG00000008248	+	
X_11104	Cauda do epidídimo	+	Intrônico	FRMPD4	-	Contendo domínios FERM e PDZ 4
X_11288	Cauda do epidídimo	-	Intrônico	ENSBTAG00000008248	+	

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela suplementar 2 - Enriquecimento funcional - ontologia de genes dos genes alvo comuns entre todos os tecido

(continua)

Categoria	Id do termo	P-valor ajustado	Nome	Descrição
Função molecular	GO: 0008569	5.812x10 ⁻⁶	Atividade motora de microtúbulos com direção negativa	Uma atividade motora que gera movimento ao longo de um microtúbulo em direção à extremidade negativa, impulsionada pela hidrólise do ATP.
Função molecular	GO: 0051959	1.66x10 ⁻⁵	Ligação com a cadeia intermediária leve da dineína	Ligação a uma cadeia intermediária leve do complexo dineína.
Função molecular	GO: 0045505	1.134x10 ⁻⁴	Ligação com a cadeia intermediária da dineína	Ligação a uma cadeia intermediária do complexo dineína.

(continuação)

Categoria	Id do termo	P-valor ajustado	Nome	Descrição
Componente celular	GO: 0030286	9.242×10^{-4}	Complexo de dineína	Qualquer um dos vários complexos grandes que contêm duas ou três cadeias pesadas de dineína e várias cadeias leves e têm atividade motora nos microtúbulos.
Componente celular	GO: 0005912	1.887×10^{-2}	Junção aderente	Uma junção célula-célula composta pelo complexo epitelial caderina-catenina. As caderinas epiteliais, ou E-caderinas, de cada célula em interação se estendem através da membrana plasmática para o espaço extracelular e se ligam umas às outras. As E-caderinas se ligam às cateninas no lado citoplasmático da membrana, onde o complexo E-caderina-catenina se liga a componentes do citoesqueleto e moléculas reguladoras e sinalizadoras.

(conclusão)				
Categoria	Id do termo	P-valor ajustado	Nome	Descrição
Componente celular	GO: 0030054	3.386×10^{-2}	Junção celular	Um componente celular que forma uma região especializada de conexão entre duas ou mais células, ou entre uma célula e a matriz extracelular, ou entre dois componentes ligados à membrana de uma célula, como flagelos.

Fonte: Elaborado pelo autor